

Vysoká škola báňská – Technická univerzita Ostrava

Univerzitní studijní programy

Nanotechnologie

**Molekulární modelování kopolymeru
polyhydroxybutyrát/polyethylen glykol jako lékového nosiče**

*Molecular modeling of polyhydroxybutyrate/polyethylene
glycol copolymer as drug carrier*

Autor:

Nikoletta Karidisová

Vedoucí bakalářské práce:

Ing. Jonáš Tokarský, Ph.D.

Ostrava 2015

Zadání bakalářské práce

Student: **Nikoletta Karidisová**

Studijní program: B3942 Nanotechnologie

Studijní obor: 3942R001 Nanotechnologie

Téma: Molekulární modelování kopolymery polyhydroxybutyrát/polyethylen glykol jako lékového nosiče
Molecular modeling of polyhydroxybutyrate/polyethylene glycol copolymer as a drug carrier

Zásady pro vypracování:

Biodegradabilní polymery, tzn. polymery schopné rozkladu na původní monomery, a jejich kopolymery se často a úspěšně používají jako nosiče léčiv.

Počítačové molekulární modelování je metoda, která umožňuje simulovat chování chemických látek a na základě molekulární struktury předvídat jejich vlastnosti. Modelovací software Materials Studio, používaný v Centru nanotechnologií na VŠB-TUO, je komplexní nástroj, schopný simulovat anorganické i organické struktury a na oddělení Bionanotechnologií je používán k simulaci nosičů léčiv.

V rámci této bakalářské práce budou připraveny modely kopolymery polyhydroxybutyrát/polyethylen glykol s různými délkami jednotlivých bloků a u takto připravených řetězců bude sledována interakce s molekulou pyrenu jakožto modelové molekuly simulující hydrofobní léčivo, chování systému kopolymer/pyren v přítomnosti vody, tuhost kopolymerních řetězců apod.. Výsledky molekulárního modelování budou porovnány s dostupnými experimentálními daty, zjištěnými z odborné literatury.

Cílem práce je podíl na vytváření metody charakterizace nosičů léčiv pomocí molekulárního modelování, které je levnou a účinnou alternativou k drahým a časově náročným laboratorním pokusům.

Postup práce:

1. Literární rešerše na dané téma a přečtení doporučené literatury.
2. Seznámení se se základy práce v modelovacím prostředí Materials Studio.
3. Stavba modelů kopolymery polyhydroxybutyrát/polyethylen glykol.
4. Simulace chování systému kopolymer/pyren v přítomnosti vody.
5. Stanovení veličin, použitých pro charakterizaci modelovaných látek.
6. Charakterizace modelovaných látek a porovnání s experimentálními výsledky z dostupné literatury.

Seznam doporučené odborné literatury:

1. HINCHLIFFE, Alan. Molecular Modelling for Beginners. 2. vyd. Velká Británie: John Wiley & Sons Ltd, 2008. ISBN 78-0-470-51313-2.
2. COMBA, Peter a Trevor W. HAMBLEY. Molecular Modeling of Inorganic Compounds, 2nd, Completely Revised and Enlarged Edition. 2. vyd. Velká Británie: John Wiley & Sons Ltd, 2008. ISBN 978-3-527-61299-4.

3. CHEN, Cheng, Chung Him YU, Yin Chung CHENG, Peter H.F. YU a Man Ken CHEUNG. Preparation and characterization of biodegradable nanoparticles based on amphiphilic poly(3-hydroxybutyrate) – poly(ethylene glycol) – poly(3-hydroxybutyrate) triblock copolymer. European Polymer Journal. 2006, Vol. 42, Iss. 10, pp. 2211-2220.
DOI: 10.1016/j.eurpolymj.2006.07.001.
Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S001430570600231X>
4. CHEN, Cheng, Chung Him YU, Yin Chung CHENG, Peter H.F. YU a Man Ken CHEUNG. Biodegradable nanoparticles of amphiphilic triblock copolymers based on poly(3-hydroxybutyrate) and poly(ethylene glycol) as drug carriers. Biomaterials. 2006, Vol. 27, Iss. 27, pp. 4804-4814.
DOI: 10.1016/j.biomaterials.2006.04.039.
Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0142961206004364>

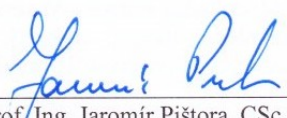
Formální náležitosti a rozsah bakalářské práce stanoví pokyny pro vypracování zveřejněné na webových stránkách Centra nanotechnologií.

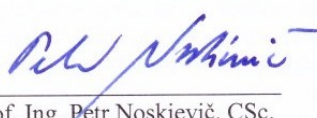
Vedoucí bakalářské práce: **Ing. Jonáš Tokarský, Ph.D.**

Konzultant bakalářské práce: Ing. Dominik Hlaváč

Datum zadání: 20.10.2014

Datum odevzdání: 15.05.2015


prof. Ing. Jaromír Pištora, CSc.
vedoucí katedry


prof. Ing. Petr Noskievič, CSc.
proréktor pro studium



Místopřísežné prohlášení

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vykonala samostatně pod vedením vedoucího bakalářské práce a uvedla jsem všechny použité podklady a literaturu.

V Ostravě dne 15.5.2015

.....

Karidisová Nikoletta

Prohlášení

- Byla jsem seznámena s tím, že na moji bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č.121/2000 Sb. – autorský zákon, zejména §35 – užití díla v rámci občanských a náboženských obřadů, v rámci školních představení a užití díla školního a §60 – školní dílo.
- Beru na vědomí, že Vysoká škola báňská – Technická univerzita Ostrava (dále jen VŠB – TUO) má právo nevýdělečně ke své vnitřní potřebě bakalářskou práci užít (§35 odst. 3).
- Souhlasím s tím, že jeden výtisk bakalářské práce bude uložen v Ústřední knihovně VŠB - TUO k prezenčnímu nahlédnutí a jeden výtisk bude uložen u vedoucího bakalářské práce. Souhlasím s tím, že údaje o bakalářské práci budou zveřejněny v informačním systému VŠB - TUO.
- Bylo sjednáno, že s VŠB-TUO, v případě zájmu z její strany, uzavřu licenční smlouvu s oprávněním užít dílo v rozsahu §12 odst. 4 autorského zákona.
- Bylo sjednáno, že užít své dílo – bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití mohu jen se souhlasem VŠB-TUO, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly VŠB -TUO na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše).
- Beru na vědomí, že odevzdáním své práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších předpisů, bez ohledu na výsledek její obhajoby.

V Ostravě dne 15.5.2015

.....

jméno a příjmení studenta

Na Šíroké 2615/4 Ostrava 70200

adresa trvalého pobytu studenta

Poděkování

Ráda bych poděkovala svému vedoucímu bakalářské práce Ing. Jonáši Tokarskému, Ph.D. za odborný přístup, cenné rady, všestranné vedení a především ochotu a trpělivost. Také bych ráda poděkovala svému konzultantovi Ing. Dominiku Hlaváčovi. Dále děkuji své rodině a přátelům za jejich podporu.

Tato bakalářská práce byla podpořena Evropským fondem regionálního rozvoje (ERDF) v rámci projektu Centra Excelence IT4Innovations (CZ.1.05/1.1.00/02.0070).

Abstrakt

Molekulární modelování s využitím empirického silového pole Compass bylo použito pro studium struktury a chování kopolymerního nosiče poly(3-hydroxybutyrát)–poly(ethylen glykol)–poly(3-hydroxybutyrát)s molekulami pyrenu představujícími hydrofobní léčivo. Modely byly podrobeny geometrické optimalizaci a molekulární dynamice. Pro charakterizaci modelů byly použity energetické i strukturní parametry a výsledky byly porovnávány s experimentálními údaji z dostupné literatury. Shoda s experimentálními údaji byla nalezena v lepším uchycení pyrenu na hydrofobním jádře, v možnosti vyššího nasycení kopolymeru pyrenem s rostoucí délkou PHB segmentů a v rostoucí velikosti nanočástic v závislosti na rostoucí délce kopolymerních řetězců. Bylo otestováno několik zjednodušení modelů, které mohou pomoci urychlit výpočty a studium takovýchto struktur. Patří zde možnosti zkrácení řetězců, obsazení pouze jednoho segmentu PHB pyreny a možnost výpočtů interakční energie časově méně náročným způsobem.

Klíčová slova:

molekulární modelování, nosiče léčiv, pyren, poly(3-hydroxybutyrát)–poly(ethylen glykol)–poly(3-hydroxybutyrát)

Vzor citace:

KARIDISOVÁ, Nikoletta. *Molekulární modelování kopolymeru polyhydroxybutyrát/polyethylen glykol jako lékového nosiče*. Ostrava, 2015. Bakalářská práce. Vysoká škola báňská - Technická univerzita Ostrava. Vedoucí práce Ing. Jonáš Tokarský, Ph.D.

Abstract

Molecular modeling utilizing empirical force field Compass was used to study structure and behavior of copolymer carrier, poly(3-hydroxybutyrate)-poly(ethylene glycol)-poly(3-hydroxybutyrate), with pyrene molecule representing a hydrophobic drug. The models were subjected to geometrical optimization and molecular dynamics. For the characterization of models, energy and structural parameters were used and results were compared with experimental data obtained from the literature. Agreement with experimental data was found in better attachment of pyrene to hydrophobic core, with the possibility of a higher saturation of copolymer with pyrene depending on increasing length of PHB and with growing size of nanoparticles in dependence on an increasing length of copolymeric chains. In order to speed up calculations and study of such structures, several simplifications were tested. This includes the possibilities of shortening the chains, surrounding only one segment of PHB by pyrene molecules, and calculating the interaction energies by less time-consuming way.

Keywords:

molecular modeling, drug loading, pyrene, poly(3-hydroxybutyrate)-poly(ethylene glycol)-poly(3-hydroxybutyrate)

Reference format:

KARIDISOVÁ, Nikoletta. *Molecular modeling of polyhydroxybutyrate/polyethylene glycol copolymer as drug carrier*. Ostrava, 2015. Bachelor thesis. VŠB – Technical University of Ostrava. Supervisor Ing. Jonáš Tokarský, Ph.D.

Obsah

Seznam použitých značek a symbolů	11
1. Úvod	12
2. Teoretická část	14
2.1. Polymery a kopolymery	14
2.1.1. Charakteristika a vlastnosti	15
2.1.2. Aplikace jako nosiče léčiv	16
2.1.3. Standardní, konstrukční a high-tech polymery	17
2.2. Polyhydroxybutyrát, polyethylenglykol, pyren	18
2.2.1. Charakteristika a vlastnosti polyhydroxybutyrátu	18
2.2.2. Příprava polyhydroxybutyrátu	19
2.2.3. Charakteristika a vlastnosti polyethylenglykolu	19
2.2.4. Příprava polyethylenglykolu	20
2.2.5. Charakteristika a vlastnosti pyrenu	20
2.2.6. Příprava kopolymeru v experimentu	21
2.3. Molekulární modelování pomocí empirických silových polí	21
2.3.1. Historie molekulárního modelování	21
2.3.2. Molekulární mechanika (MM)	23
2.3.3. Geometrická optimalizace (GO)	24
2.3.4. Universální silové pole (UFF)	24
2.3.5. Silové pole Compass	25
2.3.6. Molekulární dynamika (MD)	26
2.3.7. Výpočet mísitelnosti	27
3. Praktická část	29
3.1. Příprava iniciálních modelů a stanovení preferované pozice molekuly pyrenu na kopolymerním řetězci PHB-PEG-PHB	29
3.2. Výpočty mísitelnosti pomocí Floryho-Hugginsovy teorie v modulu Blends	32
3.3. Závislost interakční energie mezi kopolymerním řetězcem a molekulami pyrenu na jejich množství a možnost zjednodušení modelů	33

3.4.	Míra sbalení kopolymerního řetězce v závislosti na množství molekul pyrenu a možnost zjednodušení modelů.....	39
3.5.	Určení množství molekul pyrenu v reálných vzorcích.....	41
3.6.	Možnost zjednodušení modelů nahrazením kopolymerního řetězce kratšími analogy.....	42
3.7.	Struktura kopolymerní nanočástice	44
3.8.	Uchycení pyrenu.....	46
3.9.	Modely s vodou i pyrenem	50
4.	Závěr.....	53
	Reference	54

Seznam použitých zkratk

EPR	enhanced permeability and retention
PHB	polyhydroxybutyrát
PHV	polyhydroxyvalerát
PEG	polyethylenglykol
PHB-PEG-PHB	polyhydroxybutyrát-polyethylenglykol-polyhydroxybutyrát
MM	molekulární mechanika
UFF	univerzální silové pole
GO	geometrická optimalizace
MD	molekulární dynamika
DLC	drug loading content
DLE	drug loading efficiency

1. Úvod

Nanověda se zabývá výzkumem jevů a materiálových vlastností na nanometrické úrovni. Jedná se o úroveň v rozmezí jednotek až stovek nanometrů, nicméně, jako nanomateriály jsou podle dohody označovány pouze takové materiály, které mají alespoň v jednom rozměru délku menší, než 100 nm [1]. Na takto malých rozměrech se látky chovají jinak, než látky makroskopické. Důvodem vzniku neobyčejných vlastností materiálů je, že v tak malém měřítku již převažují povrchové atomy a jejich nesaturované vazby nad atomy ve vnitřním objemu. Cílem nanotechnologie je poznání a charakterizování jevů, ke kterým v nanosvětě dochází, a také využití těchto znalostí při vytváření nanosystémů. Mezi základní disciplíny, ve kterých se nanotechnologie rozvíjí, patří chemie, fyzika a biologie. V jejich rámci se nanotechnologie zkoumají v celé řadě odvětví (elektronika, optika, biotechnologie atd.). Velmi zajímavým a populárním oborem je právě biotechnologie. Rozlišujeme nanobiotechnologii využívající principy a techniky nanotechnologie pro porozumění biosystémům a bionanotechnologii, která se naopak inspirovuje živou přírodou pro tvorbu přístrojů v nanorozměrech. Souhrnně nanomedicína je oborem využívající vědu a technologii k diagnóze, terapii, prevenci chorob a mnoha dalším cílům na molekulární úrovni [2].

V oblasti nanomedicíny je zkoumáno mimo jiné aktivní směřování léků, jehož cílem je přesná lokalizace patologické oblasti a léčba účinnou koncentrací léčiva s minimálními vedlejšími účinky. Možnost nasměrování léku a zajištění jeho působení pouze v požadovaném místě vyžaduje nalezení lékových forem, do kterých je možné léčivo zabalit a dopravit na místo potřeby. Velmi perspektivní se v této oblasti jeví polymerní a liposomální lékové formy [3].

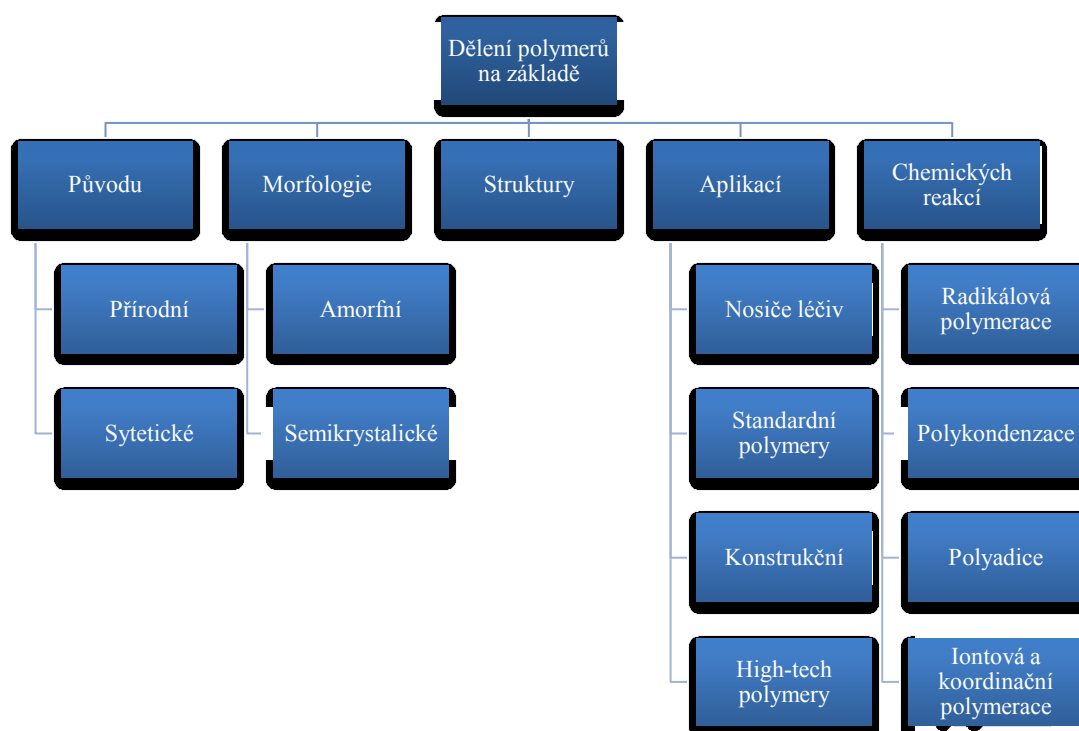
Pomocí počítačových programů je například možné zkoumat, zda je daná léková forma vhodná pro určitý typ léčiva, jaké množství léčiva je možné do ní uložit a jak se takovéto formy chovají ve vodném prostředí. Původ výpočetní chemie spočíval ve snaze zjistit vztah mezi strukturou a vlastnostmi materiálů. Za první práci v oblasti výpočetní chemie je považována teorie kvantové mechaniky. V roce 1961 využil James Hendrickson myšlenku silového pole a IBM 709 počítač k výpočtu konformační energie cyklohexanu [4]. O pět let později rozšířil využití počítačů k vizualizaci v chemii Cyrus Levinthal [5]. V letech 1960 až 1970 se začalo několik skupin zajímat o modelování systémů, možnost pokroků ve výpočetní technice, grafické technice a vývoj algoritmů. Vědci z různých oborů se začali podílet na vývoji experimentálních návrhů a nástrojů

strukturních analýz, což bylo založeno na výzkumu fyzikální a organické chemie a počítačových systémů. Výsledkem tohoto úsilí byly komerční programy dostupné od roku 1980. Výzkumné programy zahrnovaly využití molekulárních deskriptorů a rozpoznávání, zaměřovaly se na metody strukturní manipulace a analýzy a na aplikace regresních technik v souvislosti se strukturními vlastnostmi. Během rozšiřování výpočetní chemie v chemickém průmyslu se několik výzkumných laboratoří zasloužilo o vývoj související s krystalografií, molekulární grafikou a ukládáním dat. Dnes lze vybrat z rozmanitého množství simulačních programů, přičemž tento výběr závisí na látce, kterou studujeme, na čase vyhrazeném pro studium a na požadované přesnosti [6].

2. Teoretická část

2.1. Polymery a kopolymery

Slovo polymer vzniklo spojením dvou řeckých slov, a to „polys“ znamenající „hodně“ a „meros“ ve významu „část“. Základním stavebním kamenem polymerů jsou makromolekuly složené z monomerních jednotek, tak zvaných nízkomolekulárních látek. Monomer představuje seskupení atomů a vazeb, které se v polymeru neustále opakují. Charakteristická pro makromolekulární látky je velká relativní molekulová hmotnost, od desítek tisíc až po miliony $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$, a neměnnost jejich vlastností při odejmutí či přidání jedné nebo několika monomerních jednotek. Polymery mohou vznikat buďto z cyklických molekul nebo molekul obsahujících alespoň jednu dvojnou vazbu. Polymery tvořeny jediným druhem monomeru se nazývají homopolymery. Jestliže jsou v řetězci přítomny dva nebo více druhů monomerů, mluvíme o kopolymerech. Obrázek 1 přibližuje základní rozdělení polymerů [7].



Obrázek 1 Schéma základního rozdělení polymerů.

2.1.1. Charakteristika a vlastnosti

Původ

Mezi nejznámější přírodní makromolekulární látky patří především kaučuk, polysacharidy a bílkoviny. Kaučuk se nachází v buňkách spodní vrstvy kůry stromů *Hevea Brasiliensis*. Indiáni jej využívali k vytvoření míče z vyschlé kapaliny vytékající z poraněných stromů. Název *Haevea*, znamenající plačící dřevo, se používá dodnes a v překladu znamená kaučukovník. Jeho složení závisí na druhu a stáří stromu, způsobu získávání, počasí a mnoho dalším. 60% v přírodním kaučuku představuje voda, přibližně 35% uhlovodík cis-polyizopren. Zbytek tvoří cukry, bílkoviny, pryskyřice a popel. Na přelomu 19. a 20. století došlo k rapidnímu vzestupu spotřeby kaučuku, což vedlo ke snaze vytvořit kaučuk uměle. Granvil Williams izoloval z produktů destilace přírodního kaučuku čistou látku, která až dodnes nese název izopren. O téměř 20 let později se podařilo tento produkt převést zpět na kaučuk, čímž byl položen základ k výrobě syntetického kaučuku. Po roce 1900 se zjistilo, že kaučukový produkt poskytují v podstatě všechny konjugované dieny [7].

Morfologie

Chemické složení, molekulová hmotnost, struktura a teplota rozhodují o tom, ve kterém z výše uvedených fázových stavů se bude polymer nacházet. Z hlediska teplotního chování charakterizuje amorfnní polymer teplota zesklenní (T_g). V takovém stavu je uspořádání částic pravidelné pouze do vzdáleností 10^{-8} m. Skelný stav vzniká přechodem látky ze stavu kapalného do stavu pevného, přičemž nedochází k periodickému uspořádání částic. Krystalický polymer je charakterizován pravidelným uspořádáním částic a plastický polymer teplotou toku (T_f), deformace jsou v této fázi nevratné. Mezi teplotou zesklenní a teplotou toku se polymer nachází v kaučukovém stavu, kdy jsou deformace převážně vratné [7].

amorfnní polymer \leftarrow sklo $\xrightarrow{T_g}$ kaučuk $\xrightarrow{T_f}$ viskózní kapalina

Struktura polymerů

V základním dělení rozlišujeme strukturu polymerů na lineární, rozvětvené a zesíťované. Makromolekulární látky však zahrnují mnoho vlastností, které ovlivňují samotnou strukturu polymeru. Například povaha molekuly, druh a rozsah rozvětvení řetězce, stupeň vzájemného zesíťování polymerních řetězců, fázová struktura a prostorové

uspořádání. Ke změnám struktury dochází také zejména při syntéze, což je ovlivňováno způsobem polyreakce, následnou úpravou a zpracováním produktu [8].

Vznik polymerů

Makromolekuly vznikají reakcemi postupnými i řetězovými. U postupné reakce jsou meziprodukty stálé, často se dají izolovat. Růst řetězce probíhá řadou oddělených reakcí. Mezi tyto reakce patří například reakce polykondenzační, či reakce polyadiční. Pro řetězové reakce jsou typické reakce monomerů s dvojnými vazbami, například radikálová polymerace. Při polymeračních reakcích musíme brát ohled i na velmi malou koncentraci nečistot vedoucí k tomu, že na konci makromolekuly bude navázána dále nereagující látka a celý proces se zastaví. Vysoká reaktivita nečistot vedla k vynalezení velmi citlivých analytických i separačních technik k charakterizaci a odstranění nečistot [7,8].

2.1.2. Aplikace jako nosiče léčiv

Už na počátku 20. století zajímalo lékaře Paula Ehrliche, zda by bylo možné a především jak nasměrovat lék k nemocné tkáni, aby působil pouze na ni. Dnes je tak zvanému cílenému transportu léčiv a jejich řízenému uvolňování věnována velká pozornost. Nosiče totiž umožňují nejen prodlouženou cirkulaci léčiv v krevním řečišti a řízenou aktivaci, ale také jsou schopny zaměřit cílovou tkáň a minimalizovat vedlejší, nežádoucí účinky. Hlavním cílem výzkumů bylo zjistit, co je možné použít jako nosiče léčiva a jak daný nosič pozná, že dorazil na správné místo. Mezi první nosiče patřily protilátky. V dnešní době je však vyvinuta celá řada typů nosičů, mezi které patří například liposomy, nanočástice, polymerní micely aj. Vzhledem k tomu, že buňky mění svůj povrch v závislosti na prostředí, je neobyčejně těžké nalézt stálý znak, kterým by se lišila od zdravé buňky. Kvůli vysoké závažnosti nádorových onemocnění je velká pozornost věnována vývoji nosičů kancerostatik. Největší výzvou je nalezení ideálního léčiva, které nebude mít vliv na imunitní systém, nebude se ukládat například v játrech, aktivuje se pouze v místě požadovaného účinku, bude působit optimální dobu a po dosažení požadovaného efektu bude vyvedeno z organismu pryč [9,10]. Ehrlichova myšlenka kouzelné střely je dnes známá pod pojmem aktivní směřování. Existuje také pasivní směřování, které objevil japonský lékař H. Maeda se svými spolupracovníky. Všiml si tendence makromolekulárních látek nahromadit se v pevných nádorech. Pasivnímu směřování se též říká EPR efekt z anglického „*enhanced permeability and retention*“, což doslova znamená „*zvýšená propustnost a zádrž*“. Při pasivním směřování

dochází k zásobování nádoru pomocí cév propouštějící i velké molekuly, které se hromadí v pevných nádorech [9].

Způsoby cílení polymerních nosičů pro cílený transport

Existuje mnoho způsobů cíleného transportu polymerních nosičů. Nejjednodušším je lokální aplikace. Pro léčbu nádorových onemocnění jsou studovány zejména gely, implantáty, intratumorální injekce aj. Lokální aplikaci lze použít pouze u lokalizovaných nádorů. Fyzikální aktivace léčiva zvnějšku organismu, například uvolňováním léčiva z polymerní micely ultrazvukem nebo lokálním zvýšením teploty v nádorové tkáni, je další možností cíleného transportu. Nevýhodou je nutnost použití výkonného ultrazvukového svazku, který může poškodit okolní tkáň. Jiný způsob zacílení léčiva je založen na morfologické specifitě nádorové tkáně. Podstatou je velká propustnost cévního systému nádorové tkáně. Nádorová tkáň je poměrně kyselá ve srovnání s krevní plazmou. Nabízí se tedy využití systémů, které uvolní léčivo při průchodu z neutrální do mírně kyselé oblasti. Toho lze dosáhnout například pomocí liposomálních lékových forem, přičemž liposom se v kyselém prostředí rozpadne [11].

2.1.3. Standardní, konstrukční a high-tech polymery

Mezi nejznámější standardní polymery patří polyetylen a polypropylen. Hlavními důvody jejich využití je jednoduchá zpracovatelnost, dobrá chemická odolnost a elektroizolační vlastnosti, zdravotní nezávadnost a především nízká cena. Polyetylen je využíván například k výrobě folií, izolaci drátů, oproti tomu polypropylen je vhodný pro výrobu materiálů pevných a tuhých s dobrými elektroizolačními vlastnostmi. Využívá se například pro výrobu desek automobilů, součástí domácích spotřebičů, hraček, aj. [12].

Mezi konstrukční polymery se řadí především polyamidy. Tyto polymery mají vysokou houževnatost, tvrdost, odolnost proti oděru a dobré elektroizolační vlastnosti. Využití nachází jako konstrukční materiály pro výrobu ložisek, ozubených kol, hedvábných vláken, kobercových vláken, síta, fólie, aj. [12].

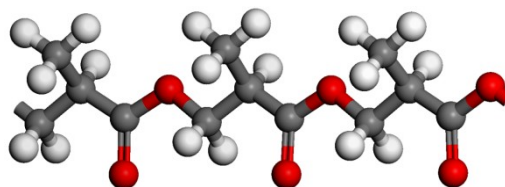
High-tech polymery se řadí mezi nejdražší polymery na trhu. Zařazeny jsou zde plasty odolné vůči vysoké teplotě, zejména polysulfon, polyimidy, polytetrafluorethylen aj. Využívány jsou například v automobilovém průmyslu [12].

2.2. Polyhydroxybutyrát, polyethylenglykol, pyren

2.2.1. Charakteristika a vlastnosti polyhydroxybutyrátu

Většina plastů není biologicky odbouratelná, což je hlavním problémem jejich zneškodňování. Velká část těchto odpadů končí na skládkách nebo v oceánu. Recyklace je možná pouze pro některé materiály a mnohdy je více energeticky náročná, než produkce nových plastů. Spalování se jeví jako další možnost jejich zneškodňování, ale uvolněné plyny mohou být toxické. Polyhydroxybutyrát (PHB) je biologicky odbouratelný polymer, jehož struktura je na Obrázku 2. Zajímavost PHB spočívá v tom, že je netoxický, biologicky odbouratelný a je produkován přirozeně některými bakteriemi. Mezi jeho další vlastnosti patří, že je termoplastický, nerozpustný ve vodě, má špatnou odolnost vůči kyselinám a zásadám a rozpouští se v chlorovaných rozpouštědlech. Jeho nevýhodou jsou vysoké výrobní náklady a relativně špatné mechanické vlastnosti. Vzhledem k biologickému mechanismu výroby PHB má velmi pravidelnou strukturu. Je téměř zcela isotaktický. To znamená, že všechny postranní skupiny na polymerním řetězci jsou ve stejném směru, což dává vzniku šroubovitě struktury s bočními skupinami směřujícími od středu spirály. Sbalené řetězce snadno tvoří krystaly a krystalický charakter polymeru jej činí křehkým a tuhým. Pozoruhodná je také jeho optická aktivita.

PHB je obtížně zpracovatelný v roztaveném stavu, protože se začíná rozkládat při teplotě o něco vyšší, než je teplota tání 175°C . Z toho důvodu může být výrobní proces upraven kopolymerací s polyhydroxyvalerátem (PHV), což snižuje teplotu tání na 75°C (v závislosti na poměru PHB a PHV) a kopolymer je tak mnohem snadněji zpracovatelný. PHV má více nepravidelnou strukturu, proto je méně krystalický, křehčí, ale přitom stále biologicky odbouratelný. Doba degradace závisí na složení PHB a okolním prostředí. PHB a jeho kopolymery jsou využívány pro výrobu jednorázového nádobí, břitev, lahví od šamponů a potravinových obalů. Vzhledem k biokompatibilitě a odbouratelnosti bylo zkoumáno použití pro řadu lékařských aplikací, včetně šicích materiálů, obvazů na rány, kostních destiček a šroubů. PHB a jeho kopolymery mohou být také využity pro řízené uvolňování léků, kdy léčivo je rozptýleno v polymeru a zatímco polymer degraduje, léčivo se pomalu uvolňuje [13].



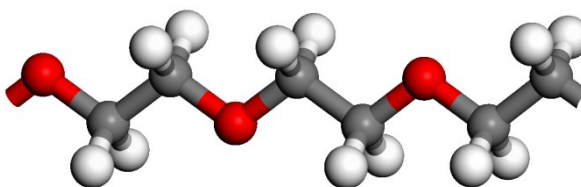
Obrázek 2 Molekulární struktura polyhydroxybutyrátu. Jsou zobrazeny tři monomerní jednotky $[-\text{CH}_2-\text{CH}(\text{CH}_3)-\text{COO}-]$. Atomy uhlíku jsou šedé, atomy kyslíku jsou červené, atomy vodíku jsou bílé.

2.2.2. Příprava polyhydroxybutyrátu

Schopnost bakterií *Bacillus megaterium* produkovat PHB objevil francouzský mikrobiolog Maurice Lemoigne v roce 1920. Má se za to, že bakterie ukládá PHB ze stejného důvodu jako savci ukládají tuk, tedy jako zdroj energie. Polymery tvoří uvnitř bakteriálních buněk jednotlivé granule, které mají průměr mezi 100 - 800 nm. Nicméně počet, velikost granulí a molekulová hmotnost polymeru se liší v závislosti na typu bakterie, podmínkách růstu a způsobu extrakce [13]. Ke komerční výrobě PHB jsou využívány také relativně levné substráty jako je methanol, ethanol, řepná melasa, třtinová melasa, škrob, syrovátka apod. [14].

2.2.3. Charakteristika a vlastnosti polyethylenglykolu

Polyethylenglykol (PEG) rozlišujeme v závislosti na délce jeho řetězce na kapalinu a pevnou látku. Kapalně PEGy jsou hygroskopické, se zvyšující se molekulovou hmotností se schopnost pohlcovat a vázat vodu snižuje. Také biologická rozložitelnost klesá s rostoucí průměrnou molekulovou hmotností. Základní jednotka lineárního řetězce PEG se skládá z monomerů $(\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O})$ a struktura PEG je zobrazena na Obrázku 3. PEG je chemicky inertní, ve vodě rozpustný a netoxický s obecným vzorcem $\text{C}_{2n}\text{H}_{4n+2}\text{O}_{n+1}$. PEG s průměrnou molekulovou hmotností $200\text{--}3500\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ se nazývají polyethylenglykoly. Produkty s vyšší molekulovou hmotností se označují jako polyethylenoxidy, neboť u těchto produktů je možné vliv koncových hydroxylových skupin zanedbat. Různé typy PEG rozlišujeme podle jejich teploty tání, tvrdosti a výše zmíněné molekulové hmotnosti. Důležitou vlastností všech PEGů je jejich rozpustnost ve vodě. PEG má velmi nízkou toxicitu, proto je využíván jako lékový nosič, v průmyslových aplikacích, v buněčném biologickém výzkumu, v kosmetice a v potravinářství. PEG může být připraven ve formě tekutého přípravku, masti, čípku či tablet [15].



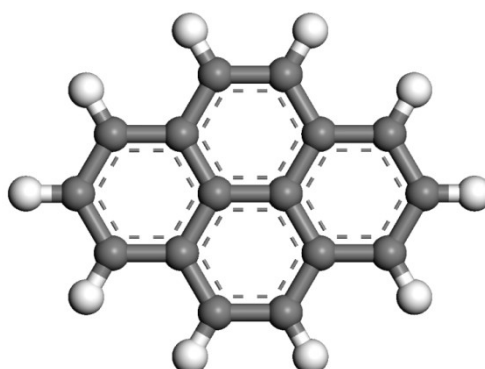
Obrázek 3 Molekulární struktura polyethylenglykolu. Jsou zobrazeny tři monomerní jednotky $[-\text{CH}_2-\text{CH}_2-\text{O}-]$. Atomy uhlíku jsou šedé, atomy kyslíku jsou červené, atomy vodíku jsou bílé.

2.2.4. Příprava polyethylenglykolu

PEG se vyrábí polymerací ethylenoxidu alkalickou katalýzou s vodou, monoethylenglykolem nebo diethylenglykolem. Po dosažení požadované molekulové hmotnosti se reakce zruší přidáním kyseliny, například kyseliny mléčné. Reakčním mechanismem je kyselá katalýza, která může být zastavena přidáním vody s mírně zvýšeným pH [15].

2.2.5. Charakteristika a vlastnosti pyrenu

Pyren je polycyklický aromatický uhlovodík skládající se ze čtyř benzenových kruhů s chemickým vzorcem $\text{C}_{16}\text{H}_{10}$ (viz Obrázek 4). Jedná se o bezbarvou, sypkou, pevnou a především škodlivou látkou způsobující zčervenání kůže a očí. Molární hmotnost pyrenu činí $202 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, teplota tání je přibližně 150°C a bod varu 393°C . Pyren je nerozpustný ve vodě, stabilní, hořlavý a nesnáší se se silnými oxidačními činidly. Vyskytuje se v černouhelném dehtu. Používá se společně se svými deriváty jako molekulární sonda ve fluorescenční spektroskopii [16].



Obrázek 4 Molekulární struktura pyrenu ($\text{C}_{16}\text{H}_{10}$). Atomy uhlíku jsou šedé, atomy vodíku jsou bílé.

2.2.6. Příprava kopolymeru v experimentu

Kopolymer PHB-PEG-PHB byl syntetizován kopolymerací za otevření kruhu monomeru β -butyrolaktonu s využitím PEG jako makroiniciátoru. Obě látky byly spolu s oktoátem cínatým, rozpuštěným v dichlormethanu, umístěny do polymerační nádoby a reakce proběhla za stálého míchání v inertní dusíkaté atmosféře. Pro následné odstranění dichlormethanu byla směs zahřívána pod nízkým tlakem na 40 °C po dobu 1 hodiny. Dále byla směs opakovaně rozpuštěna v trichlormethanu a vysrážena v hexanu s cílem odstranit nezreagovaný β -butyrolakton. Výsledný kopolymer byl sušen ve vakuu při teplotě 40 °C po dobu 48 hodin.

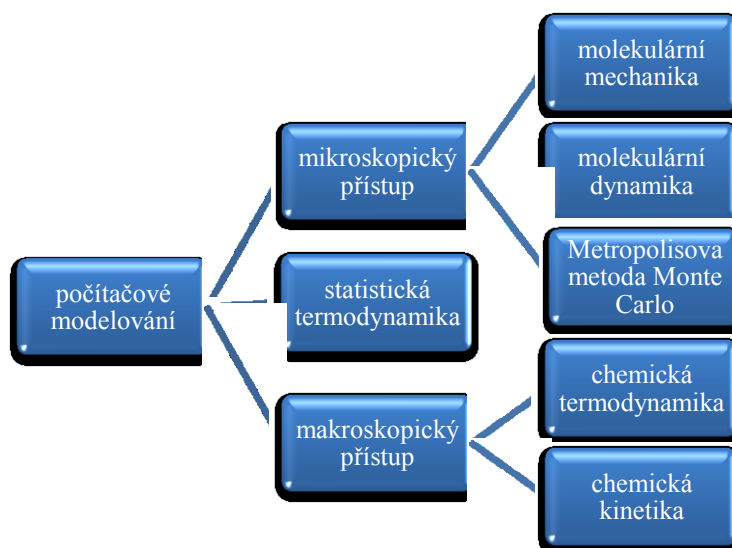
Vodná disperze nanočástic kopolymeru PHB-PEG-PHB byla připravena srážecí/odpařovací technikou bez použití surfaktantů. Roztok kopolymeru PHB-PEG-PHB v acetonu byl po kapkách přidáván k sonifikované destilované a deionizované vodě. Aceton byl následně odstraněn snížením tlaku a sonifikací roztoku [17].

2.3. Molekulární modelování pomocí empirických silových polí

2.3.1. Historie molekulárního modelování

Důvodem pro vznik výpočetní chemie byla touha zjistit a pochopit strukturu molekul, jejich vlastnosti, demonstrovat průběh reakcí a v neposlední řadě také možnost nahradit experimentální práci. V roce 1961 James Hendrickson prokázal možnost využití počítačů k výpočtům molekulární energetiky a o pět let později Cyrus Levinthal navrhl parametr vizualizace. Během let 1960-1970 se začal chemický průmysl značně vyvíjet [6]. V roce 1970 poprvé manželé David a Jane Richardsonovi a jejich kolegové vytvořili počítačově strukturu proteinu. Od roku 1970 již byly vytvořeny algoritmy pro počítačovou reprezentaci molekulárního modelování.

Obrázek 5 ukazuje dělení počítačového modelování na tři velké skupiny: mikroskopický přístup, makroskopický přístup a statistická termodynamika. V rámci mé bakalářské práce bude věnována pozornost pouze prvnímu přístupu, ostatní dvě skupiny budou jen lehce nastíněny.



Obrázek 5 Základní rozdělení přístupů k počítačovému modelování.

Metody makroskopického přístupu vycházejí z postulátů odvozených z experimentů. Patří zde chemická kinetika a chemická termodynamika. Při počítačovém modelování jsou veličiny nahrazeny metodami statické termodynamiky. V chemické termodynamice se využívá Hessova termochemického zákona. Tento zákon říká, že tepelné zbarvení dané reakce je rovno součtu tepelných zbarvení dílčích reakcí, které vycházejí ze stejných výchozích látek a poskytují stejné produkty jako dané reakce. Podstatou je zkoumání výměny energie mezi ustálenými stavy soustav [18].

$$(\Delta H^{\circ}_{298,15})_{A \rightarrow B} = (\Delta H^{\circ}_{298,15})_{A \rightarrow C} + (\Delta H^{\circ}_{298,15})_{C \rightarrow B} \quad (1)$$

Počítačové modelování v chemické kinetice se zabývá časovým průběhem reakcí a výpočtem rychlostních konstant. Vychází z Eyringovy teorie aktivovaného komplexu neboli teorie absolutní reakční rychlosti. Aktivovaný komplex je přechodná struktura mezi reaktanty a produkty. Ovšem autoři Eyringovy teorie pracovali s tímto nestabilním komplexem jako se stavem rovnovážným, což jim umožnilo dojít ke vztahu:

$$k = \frac{kt}{h} \exp\left(-\frac{\Delta G^{\#}}{RT}\right) \quad (2)$$

Tento vztah udává rovnost mezi rychlostní konstantou dopředné reakce a Gibbsovou aktivační energií, kde R je plynová konstanta [18]. Základem statistické termodynamiky je velký počet molekul sledovaný po dostatečně dlouhou dobu. Na základě jejich pohybu a vzájemné interakce jsou výsledkem makroskopické vlastnosti hmoty. Systém, nacházející

se v mnoha kvantových stavech, se nazývá mikrostav. Zprůměrovaný projev všech mikrostavů se nazývá makrostav. Veličina, kterou se snažíme získat sumací přes všechny stavy molekuly, se nazývá molekulární partiční funkce. Tato funkce má za konstantního počtu částic, tlaku i objemu tvar:

$$Q = \sum_i \exp \left(-\frac{E_i}{kT} \right) \quad (3)$$

kde E_i je energie i -té částice, k je Boltzmannova konstanta a T je absolutní teplota. Z partiční funkce lze dále zjistit změnu Helmholtzovy energie při přechodu mezi dvěma rovnovážnými stavy A a B [19]:

$$\Delta F = -kT \ln \frac{Q_B}{Q_A} \quad (4)$$

Modelování v mikroskopickém přístupu zahrnuje mnoho způsobů modelování, přičemž vždy nás zajímá struktura molekul, jejich funkce a interakce [18].

2.3.2. Molekulární mechanika (MM)

Termín molekulární mechanika byl poprvé použit v roce 1970 k popisu aplikací klasické mechaniky a k určení molekulární rovnováhy struktur. Klíčové poznatky k rozvoji MM přinesli R.G. Snyder a J.H. Schachtschneider. Autoři došli k tomu, že v molekulární mechanice je třeba brát v úvahu nevazebné interakce pouze mezi nejbližšími sousedícími atomy, chemické prostředí atomů a atomový typ. Se silovým polem je zacházeno jako se sadou konstant, které jsou stanoveny experimentálně či přesnými výpočty [19]. MM umožňuje optimalizovat model metodami minimalizace potenciální energie. Výpočty probíhají pro teplotu absolutní nuly a kinetická energie je tudíž zanedbávána. Potenciální energie je rozdělena na potenciály vazebné a nevazebné. Nevazebné potenciály zahrnují síly nezávislé na intramolekulárních vazbách, například síly intermolekulární, Coulombovy, van der Waalsovy, dipólové. Podnětem vzniku vazebného potenciálu je odchylka vazebných parametrů od tabulkových hodnot. Patří zde délka vazby, vazebný úhel a podobně. Dnes již existuje mnoho programů, které jsou schopny přiřadit molekulám potenciály na základě experimentálních výsledků a výsledků kvantové mechaniky. V mé praktické části jsem pracovala se silovým polem Compass. Celkový potenciál přiřazený programem představuje střední hodnotu potenciálů látek podobné struktury [18].

2.3.3. Geometrická optimalizace (GO)

Vstupem pro výpočty molekulární mechaniky je vždy počáteční model, který má být optimalizován. GO je metoda hledající lokální minimum potenciální energie namodelované molekuly. Globální minimum pak představuje energicky nejvýhodnější a konečné seskupení atomů dané molekuly. Zásadní při GO tedy je, aby program rozpoznal, která nízkoenergetická konformace bude molekule přiřazena. To lze zjistit dvěma způsoby. Jedním je průzkum parametrů, které mají konečný vliv na energii. Zde patří změny rotace vazebných úhlů, změna délek vazeb a podobně. Druhou možností je prohlédnout struktury molekul, které mají nepříznivě blízko nevazebné atomy a nepravděpodobně kruhově uzavřené vazby. Dále následuje otázka, zda by měla být počáteční struktura stejná pro všechny GO nebo zda by každá GO měla začít strukturou nalezenou předešlou GO. Výhodnější je samozřejmě využít již zoptimalizovanou strukturu, neboť bude mít sklon k udržování vyhledávání v nízkoenergetické oblasti potenciálního povrchu. Při GO dochází ke změnám parametrů molekuly. Změny mohou být buď náhodné, nebo systematické. U systematických odchylek je obvyklé prohlédnout nejprve povrch nízkým rozlišením a poté upřesnit hledanou oblast vysokým rozlišením. U náhodných odchylek je problém s výpočetním postupem, neboť metoda pokus-omyl vede ke konformacím, které musejí být stejně znova prozkoumány [18]. Při spuštění GO nastavujeme vždy podmínky, za kterých budou výpočty probíhat. Podmínky mých výpočtů jsou popsány v praktické části.

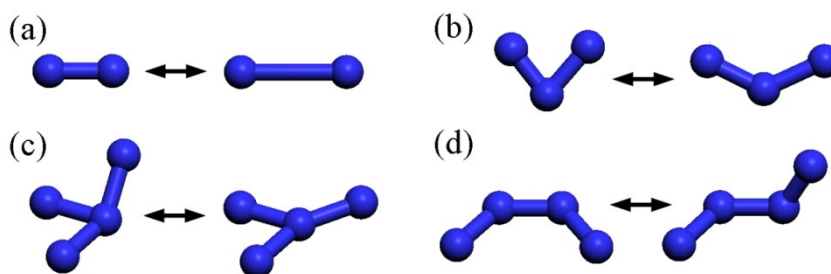
2.3.4. Universální silové pole (UFF)

K usnadnění studia různých atomových seskupení bylo vytvořeno mnoho silových polí. Silová pole jsou sadou základních parametrů závislých na prvku, jeho hybridizaci a schopnosti chemicky se vázat. Mezi tyto parametry patří například sada hybridizační závislosti na atomovém poloměru vazeb, sada hybridizačních úhlů, van der Waalsovy parametry, torzní a inverzní bariéry a sada jaderných nábojů. Jakýkoli prvek periodické tabulky patří v UFF pod některý ze 126 atomových typů. K popisu atomového typu je používáno pět následujících znaků – chemický symbol (dva znaky), hybridizace či geometrie (jeden znak), čtvrtý a pátý znak je využíván pro alternativní parametry, například oxidační číslo. Příklad: Rh6+3 = oktahedrální rhodium s oxidačním číslem 3.

Jak už bylo výše zmíněno, potenciální energie nahodilé geometrie molekuly, je dána sumací vazebné a nevazebné interakce, pro kterou platí následující vztah:

$$E_{total} = E_b + E_\theta + E_\phi + E_\chi + E_{vdw} + E_{el} \quad (5)$$

přičemž členem E_b se rozumí vazebná energie (stretching bond), energii vazebného úhlu (angle distortion) vyjadřuje člen E_θ , torzní energii (dihedral angle torsion) představuje E_ϕ a úhel odklonění od roviny (out-of-plane angle potential) je popsán členem E_χ , člen E_{vdw} představuje van der Waalovu energii a příspěvek elektrostatické energie je dán členem E_{el} [20]. Geometrie popisované vazebnými členy E_b , E_θ , E_ϕ , E_χ jsou znázorněny na Obrázku 6.



Obrázek 6 Zobrazení geometrií popisovaných vazebnými členy celkové potenciální energie systému. (a) E_R – vazebná energie, (b) E_θ – energie vazebného úhlu, (c) E_χ – úhel odklonění od roviny, (d) E_ϕ – torzní energie.

2.3.5. Silové pole Compass

Compass je první *ab initio* silové pole, které umožňuje přesně předpovídat vlastnosti plyných a kondenzovaných fází pro široký okruh molekul a polymerů. Je to také první silové pole s parametry jak pro organické tak i pro anorganické látky. Všechna silová pole mají stejný tvar funkce potenciální energie, liší se pouze počtem funkčních členů, pro které jsou parametrizovány. Parametrizace při vývoji tohoto pole probíhala na základě *ab initio* výpočtů a empirické optimalizace. V první fázi byly parciální náboje a valenční parametry odvozeny z *ab initio* výpočtů. V druhé fázi byl kladen důraz na optimalizaci silového pole ve shodě s experimentálními daty. Mezi vlastnosti, které dokáže silové pole předpovídat, patří molekulární struktura, vibrační frekvence, konformační energie a další.

Potenciál funkce může být rozdělen na dvě části. Jedna část zahrnuje valenční výrazy a druhá část zobrazuje nevazebné interakční členy. Valenční výrazy představují energii vazebnou (E_b), úhlovou (E_θ), torzní energii (E_ϕ) a úhel odklonění od roviny (E_χ), dále pak

jsou ve funkci obsaženy křížové členy (tzv. *cross-termy*) vazba-vazba (E_{bb}), vazba-úhel ($E_{b\theta}$), vazba-torze ($E_{b\phi}$), úhel-úhel ($E_{\theta\theta}$) a úhel-úhel-torze ($E_{\theta\theta\phi}$). Nevazebné výrazy zahrnují Lennard-Jonesův potenciál pro vdW interakce a coulombický potenciál pro elektrostatické interakce.

Potenciální energie je u silového pole Compass popsána následujícím vztahem:

$$\begin{aligned}
 E_{total} = & E_b + E_\theta + E_\phi + E_\chi + E_{bb'} + E_{b\theta} + E_{b\phi} + E_{\theta\theta'} + E_{\theta\theta'\phi} + \\
 & E_{el} + E_{LJ} = \sum_b [K_2(b - b_0)^2 + K_3(b - b_0)^3 + K_4(b - b_0)^4] + \\
 & \sum_\theta [H_2(\theta - \theta_0)^2 + H_3(\theta - \theta_0)^3 + H_4(\theta - \theta_0)^4] + \sum_\phi [V_1(1 - \cos\Phi) + \\
 & V_2(1 - \cos 2\Phi) + V_3(1 - \cos 3\Phi)] + \sum_\chi K_\chi(\chi - \chi_0)^2 + \sum_{b,b'} F_{b,b'}(b - \\
 & b_0)(b' - b'_0) + \sum_{b,\theta} F_{b\theta}(b - b_0)(\theta - \theta_0) + \sum_{b,\phi}(b - b_0)[F_{b,\phi}^{(1)}(1 - \\
 & \cos\Phi)F_{b,\phi}^{(2)}(1 - 2\cos\Phi) + F_{b,\phi}^{(3)}(1 - 3\cos\Phi)] + \sum_{\theta,\theta'} F_{\theta,\theta'}(\theta - \\
 & \theta_0)(\theta' - \theta'_0) + \sum_{\theta,\theta\phi} F_{\theta,\theta\phi}(\theta - \theta_0)(\theta' - \theta'_0)\cos\Phi + \sum_{i,j} \frac{q_i q_j}{\epsilon_0 r_{ij}} + \\
 & \sum_{i,j} \epsilon_{ij} \left[2\left(\frac{r_{ij}^0}{r_{ij}}\right)^9 - 3\left(\frac{r_{ij}^0}{r_{ij}}\right)^6 \right]
 \end{aligned} \tag{6}$$

Lennard-Jonesovy parametry (ϵ a r_0) pro pár atomů obsahují parametrizační sadu hodnot. Tyto tvary byly využity pro interakce mezi páry atomů, které byly separovány na dvě nebo více částí. Elektrostatická interakce je reprezentována parciálním nábojem modelu využívajícím náboj vazebného přírůstku δ_{ij} , separovaného náboje mezi dvěma atomy. Parciální náboj atomu je vyjádřen jako sumace všech nábojů vazebných přírůstků tohoto atomu.

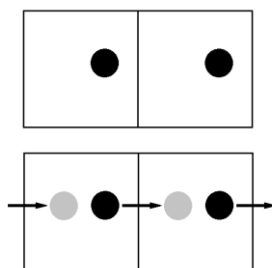
$$q_i = \sum_j \delta_{ij} \tag{7}$$

kde j reprezentuje všechny atomy, které mají valenční vazbu s i -tým atomem. Více informací o silovém poli Compass lze nalézt v článcích publikovaných Sunem a jeho spolupracovníky [21,22,23].

2.3.6. Molekulární dynamika (MD)

Molekulární dynamika vychází z klasické mechaniky, konkrétně Newtonových rovnic. Její princip spočívá ve vystavení všech atomů původního modelu náhodnému impulzu, který způsobí jejich pohyb. Kvůli počátečnímu impulzu dojde ke změně geometrie molekuly a potenciální energie systému je tudíž jiná, než hodnota potenciální

energie původní molekuly. Atomy se pohybují v poli konstantní potenciální energie pouze po dobu 1 fs. To znamená, že geometrie molekuly i hodnota potenciální energie se každou femto-sekundu mění a musí být znova vypočítána. Výsledkem je soubor konformací namodelované látky, ze kterého je možné nalézt nepravděpodobnější pohyb molekuly [18]. Výpočty mohou probíhat buď v periodické, nebo neperiodické cele. V neperiodické cele vykazují atomy různé výsledné síly v závislosti na jejich poloze. V průběhu MD se může stát, že se atom či skupina atomů dostanou z cely ven, což změní hustotu systému. Koncept periodické cely tyto problémy úspěšně vyřešil. Na každou plochu cely navazuje další cely, přičemž jejich stěny jsou průchozí. Pokud se atom či skupina atomů během MD dostanou mimo cely, zobrazí se jeho obraz v cele přilehlé, což jinými slovy znamená, že vstoupí do téže cely z druhé strany (viz Obrázek 7) [19]. Pro MD je třeba také vždy zadat podmínky, za kterých budou výpočty probíhat. Podmínky mých výpočtů jsou uvedeny v praktické části.



Obrázek 7 Periodicita cely simulující nekonečné prostředí funguje tak, že objekt opouštějící cely z jedné strany do ní zároveň vstupuje ze strany protilehlé.

2.3.7. Výpočet mísitelnosti

Párové interakce složek ve směsích charakterizují vzájemné rozpustnosti. Tyto interakce byly studovány využitím Floryho-Hugginsovy teorie [24] v modulu Blends modelovacího prostředí Accelrys Materials Studio. Při výpočtu interakční energie dvojice je jedna molekula brána jako základ (báze) a druhá molekula je k ní různě orientovaná (screen). V průběhu výpočtu se generuje mnoho konfigurací daného páru, a proto se na vazebné energie musí pohlížet jako na průměry přes soubor konfigurací těchto párových molekul. Obecné vyjádření volné energie mísitelnosti v binárním systému je:

$$\frac{\Delta G}{RT} = \frac{\Phi_b}{n_b} \ln \Phi_b + \frac{\Phi_s}{n_s} \ln \Phi_s + \chi \Phi_b \Phi_s \quad (8)$$

kde ΔG je volná energie mísitelnosti, Φ_b je objemový podíl báze (statická struktura), n_b je stupeň polymerace báze, Φ_s je objemový podíl screenu (struktura generovaná

v každém kroku výpočtu na jiném místě v okolí báze), n_s je stupeň polymerace screenu, χ je interakční parametr, T je absolutní teplota a R je plynová konstanta. První dva členy v rovnici (8) popisují entropii, která vyjadřuje upřednostňování mísitelnosti čistých složek, a jsou negativní. Třetí člen je volná energie vznikající v důsledku interakce. U mřížky s koordinačním číslem Z je energie mísitelnosti (E_{mix}) popsána vztahem:

$$E_{mix} = \frac{1}{2}Z(E_{bs} + E_{sb} - E_{bb} - E_{ss}) \quad (9)$$

kde E_{bs} , E_{sb} , E_{bb} a E_{ss} jsou vazebné energie, přičemž indexy b a s představují molekulu báze a screenu [25,26]. Modul Blends pracuje s tzv. *off-lattice* (tedy *bezmřížkovými*) výpočty, tzn. koordinační číslo Z je počítáno pro každý z generovaných molekulárních párů využitím molekulární simulace a mřížka v modelu není přítomna. E_{mix} lze v takovém případě vyjádřit jako:

$$E_{mix} = \frac{1}{2}(Z_{bs}(E_{bs})_T + Z_{sb}(E_{sb})_T - Z_{bb}(E_{bb})_T - Z_{ss}(E_{ss})_T) \quad (10)$$

Nízká hodnota E_{mix} naznačuje, že při konkrétní teplotě spolu budou dvě molekuly snadno interagovat. Pokud je hodnota E_{mix} vysoká, molekuly se budou raději obklopovat stejnými molekulami a v tomto případě bude binární směs rozdělena na dvě fáze. Interakční páry pro všechny komponenty v binárním systému byly počítány s použitím silového pole Compass, který také přiřadil náboje. Pro výpočet vazebných energií E_{bs} , E_{sb} , E_{bb} a E_{ss} byl pro každý pár vygenerován jeden milion kombinací. Koordinační číslo Z bylo počítáno z deseti tisíc vzájemných konfigurací, přičemž bylo použito dvacet iteračních kroků k postavení jedné konfigurace [25,26].

3. Praktická část

3.1. Příprava iniciálních modelů a stanovení preferované pozice molekuly pyrenu na kopolymerním řetězci PHB-PEG-PHB

Prvním krokem praktické části byla příprava modelů jednotlivých struktur (kopolymerní řetězce PHB-PEG-PHB a molekuly pyrenu) v modulu MS Visualizer. Atomární struktury PHB a PEG byly vzaty z článku Chena a kol. [27]. Struktura pyrenu byla vzata z článku Esguerry a kol. [28]. Dále v textu této práce budou všechny řetězce $(\text{PHB})_x-(\text{PEG})_y-(\text{PHB})_x$ značeny pouze čísly udávajícími počet monomerů, tzn. obecně $x-y-x$. V tomto prvním kroku byly postaveny tři řetězce typu 7-91-7, 24-91-24 a 55-91-55. Poměry PHB a PEG segmentů byly zvoleny na základě experimentu Chena a kol. [27].

Po předběžném vyčištění připravených struktur nástrojem *Clean* (upravuje vazebnou geometrii molekul podle jednoduchých pravidel, jako např. planarita aromatických jader, vazebné úhly v závislosti na hybridizaci uhlíku apod.) byla z řetězců a pyrenů připravena první sada osmnácti iniciálních modelů. Tyto modely byly připraveny jako neperiodické, obsahovaly tedy pouze jeden řetězec PHB-PEG-PHB a jednu molekulu pyrenu bez “zrcadlových obrazů” (viz kapitola 2.3.6 *Molekulární dynamika (MD)* v Teoretické části). Prvním úkolem bylo zjistit místo v kopolymerním řetězci, se kterým molekula pyrenu interaguje nejsilněji. Molekuly pyrenu byly orientovány rovnoběžně a kolmo vůči PEG části řetězce, PHB části řetězce a vůči místu jejich spojení.

GO modelů byla provedena v modulu MS Forcite. Pro parametrizaci jednotlivých atomů bylo použito silového pole Compass [22,23], přičemž náboje atomů byly přiřazeny tímto silovým polem. Konvergenční kritéria GO pro energii ($1 \cdot 10^{-4}$ kcal/mol), sílu (0.005 kcal/mol/Å) a pozici ($5 \cdot 10^{-5}$ Å) a zvolený počet kroků 500 000 byly více než postačující. Ke konvergenci došlo u těchto modelů (obsahovaly 833 atomů) vždy před dosažením 14 000 kroků. K optimalizaci modelů byl použit algoritmus Smart, což je kaskáda tří na sebe navazujících optimalizačních algoritmů (Metoda největšího spádu, Metoda konjugovaných gradient, Kvazi-Newtonova metoda).

Pro každý z optimalizovaných modelů byla zjištěna hodnota interakční energie (E_{int}), která popisuje intenzitu nevazebných sil působících mezi řetězcem PHB-PEG-PHB a molekulou pyrenu, a je počítána podle následujícího vzorce:

$$E_{int} = E_{\text{PHB-PEG-PHB/pyren}} - (E_{\text{PHB-PEG-PHB}} + E_{\text{pyren}}) \quad (11)$$

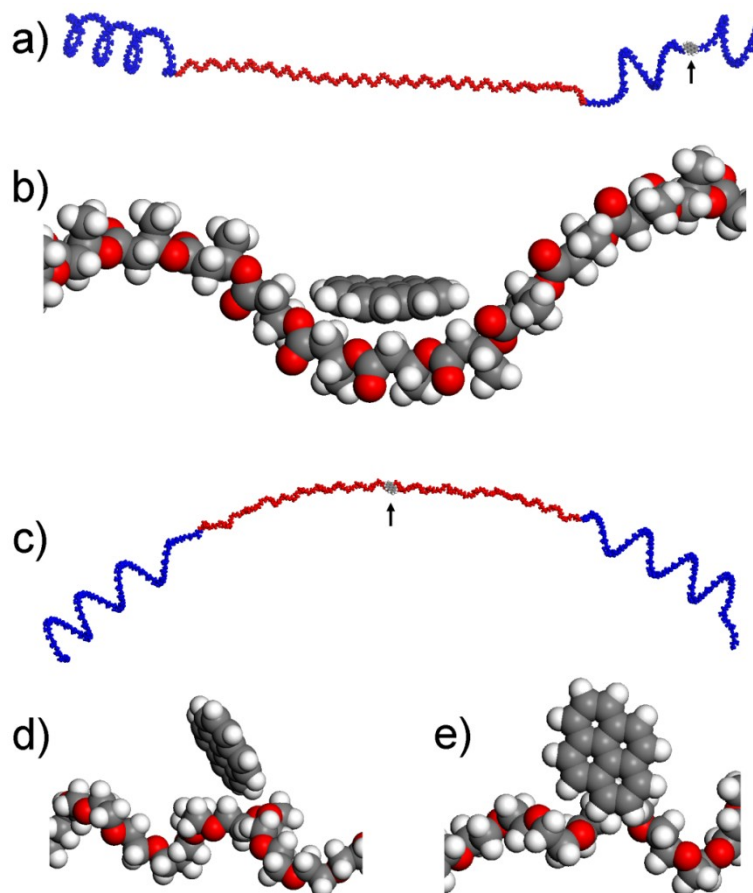
kde $E_{PHB-PEG-PHB/pyren}$ je totální potenciální energie celého systému PHB-PEG-PHB/pyren, $E_{PHB-PEG-PHB}$ je totální potenciální energie samotného kopolymerního řetězce a E_{pyren} je totální potenciální energie samotné molekuly pyrenu. Energie jsou udávány v jednotkách [kcal/mol]. Hodnoty E_{int} pro výše zmíněné modely jsou uvedeny v Tabulce 1.

Tabulka 1 Hodnoty E_{int} (kcal/mol) pro různá postavení molekuly pyrenu vůči různým částem kopolymerního řetězce. PHB-PEG představuje místo spojení segmentů PHB a PEG.

Typ řetězce	Část řetězce	Orientace pyrenu	
		Rovnoběžně	Kolmo
7-91-7	PHB	-12.58	-23.33
	PEG	-12.92	-11.36
	PHB-PEG	-11.35	-8.88
24-91-24	PHB	-37.28	-37.66
	PEG	-25.85	-23.39
	PHB-PEG	-33.32	-35.29
55-91-55	PHB	-59.98	-26.79
	PEG	-15.12	-19.20
	PHB-PEG	-27.11	-26.71

Tabulka 1 ukazuje, že hodnoty E_{int} v modelech pyrenu s nejkratším řetězcem nenásledují stejný trend, jako hodnoty E_{int} v modelech s řetězcí 24-91-24 a 55-91-55. Interakce mezi segmentem PEG a pyrenem orientovaným rovnoběžně s řetězcem je silnější (tzn. hodnota E_{int} je zápornější), než u pozic PHB a PHB-PEG na řetězcí, což neodpovídá výsledkům získaným z modelů s delšími PHB segmenty. V případě kolmo orientovaných molekul pyrenu je interakce nejsilnější v případě umístění v blízkosti PHB, což dobře souhlasí s delšími řetězcí, ale interakce pyrenu s PEG je silnější, než s místem PEG-PHB, což opět nesouhlasí s výsledky získanými z modelů s delšími segmenty PHB. Na základě hodnot E_{int} pro modely s řetězcí 24-91-24 a 55-91-55 lze konstatovat, že molekula pyrenu přednostně zaujímá místo poblíž segmentů PHB, zatímco PEG není pro pyren preferovaným místem. Energeticky nejvýhodnější pozice pyrenu (tzn. hodnota E_{int} je nejzápornější) a nejméně výhodná pozice pyrenu (tzn. hodnota E_{int} je nejméně záporná) vůči řetězcí 55-91-55 jsou zobrazeny na Obrázku 8. Obrázky 8a,b ukazují model kopolymerního řetězce s molekulou pyrenu velmi pevně ($E_{int} = -59.98$ kcal/mol) zachyceným na PHB. Je vidět, že molekula pyrenu leží rovnoběžně s řetězcem, jehož methylové skupiny jsou odvráceny na opačnou stranu. Obrázky 7c,d,e ukazují molekulu pyrenu velmi slabě ($E_{int} = -15.12$ kcal/mol) zachycenou na PEG segmentu kopolymerního

řetězce. Molekula pyrenu neleží podél řetězce, je k němu postavena zešikma a větší svou částí ční mimo řetězec.



Obrázek 8 Optimalizované modely kopolymerních řetězců PHB-PEG-PHB typu 55-91-55 s molekulami pyrenu. (a) Celkový pohled na model řetězce (segmenty PHB jsou modré, segment PEG je červený) s pyrenem velmi pevně ($E_{int} = -59.98$ kcal/mol) zachyceným na PHB. (b) Detailní pohled na pyren a jeho nejbližší okolí v tomto modelu. Atomy uhlíku jsou šedé, atomy kyslíku jsou červené, atomy vodíku jsou bílé. (c) Celkový pohled na model řetězce (segmenty PHB jsou modré, segment PEG je červený) s pyrenem velmi slabě ($E_{int} = -15.12$ kcal/mol) zachyceným na PEG. (d) a (e) Ukazuje detailní pohledy ze dvou různých směrů na pyren a jeho nejbližší okolí v tomto modelu. Atomy uhlíku jsou šedé, atomy kyslíku jsou červené, atomy vodíku jsou bílé.

Tyto výsledky jsou ve shodě s výsledky z článku Chena a kol. [17], kde bylo zkoumáno uchycení hydrofobního léčiva v polymerních nanočásticích pomocí interakcí mezi hydrofobním léčivem a segmenty polymeru. V Tabulce 3 výše zmíněného článku [17] jsou uvedeny hodnoty DLC (*drug loading content*, neboli množství léčiva v nosiči) a DLE (*drug loading efficiency*, neboli míra úspěšnosti nasycení nosiče léčivem) pro vzorky 24-91-24, 90-91-90 a 187-91-187. Jedná se o hmotnosti pyrenů v miligramech vztažené na celkovou hmotnost (v gramech) nanočástic tvořených kopolymerem a pyrenem. Bylo zjištěno, že s rostoucí délkou PHB bloku kopolymeru se pyren (představující hydrofobní

lčivo) zachycuje na hydrofobním jádře lépe. Autoři take uvádí, že s rostoucí krystalinitou kopolymeru se hodnota DLC a DLE snižuje. To znamená, že lčivo se ukládá lépe do jádra amorfního než jádra krystalického. Zjištění, že hydrofobní jádro je schopno pojmout více lčiva, pokud je obklopeno delšími PHB segmenty, se dalo předpokládat, neboť čím větší kopolymer bude, tím více prostoru bude v jádře k dispozici pro uložení lčiva.

3.2. Výpočty mísitelnosti pomocí Floryho-Hugginsovy teorie v modulu Blends

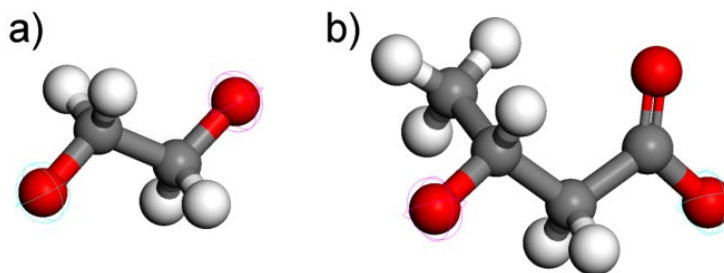
Pro zjištění, které místo na PHB-PEG-PHB řetězci je preferováno molekulou pyrenu, byly rovněž použity výpočty vzájemné mísitelnosti podle modifikované Floryho-Hugginsovy teorie, jak je implementována v modulu Blends. Pro tento účel byly připraveny tři iniciační modely: monomer PHB, monomer PEG a molekula pyrenu. Tyto molekuly byly následně ve výpočtu použity jaké báze (statická struktura) či jako screen (struktura generovaná v každém kroku výpočtu na jiném místě v okolí báze). Na tomto místě je třeba vysvětlit, proč byly pro výpočet mísitelnosti pyrenu a polymerního řetězce použity monomery. Zatímco u GO či MD prochází modelovaný systém strukturními změnami, výpočet mísitelnosti podle Floryho-Hugginsovy teorie v modulu Blends pracuje s modely (báze a screen), jejichž struktura se nemění. Jsou sice generována obrovská množství různých vzájemných postavení báze a screenu, ale jejich intramolekulární geometrie je stále stejná. K přesnému určení hodnot E_{mix} by tak v případě použití celého řetězce bylo potřeba spočítat mísitelnost za použití všech možných (tedy prakticky nekonečně mnoha) geometrií tohoto řetězce, od zcela rovného přes všechny varianty mírného zkroucení až po všechny varianty plného sbalení, neboť nevíme, která jeho geometrie je při interakci s pyrenem ta správná. Argument, že tuto geometrii přeci známe z výsledku GO, neobstojí, neboť v případě použití řetězce z optimalizovaného modelu bychom při výpočtu mísitelnosti pouze dublovali již dosažený výsledek, zatímco výpočet mísitelnosti má sloužit k nezávislému potvrzení tohoto výsledku. Z tohoto důvodu je vhodné použít pro zastoupení polymerního řetězce pouze jednu základní strukturní jednotku. Aby bylo zabráněno generování takových párů, při nichž by se molekula pyrenu objevila v místě, kde má na strukturní jednotku z jedné či druhé strany navazovat další strukturní jednotka, lze při výpočtu v modulu Blends označit u strukturní jednotky oblast, v níž se molekula pyrenu objevit nesmí (viz Obrázek 9). Tabulka 2 obsahuje hodnoty všech členů rovnice (10) (viz kapitola 2.3.7 *Výpočet mísitelnosti* v Teoretické části této práce) a výsledné hodnoty E_{mix} .

Tabulka 2 Výsledné hodnoty z výpočtu mísitelnosti PEG, PHB a pyrenu. Energie vzájemného mísení (E_{mix}) je uvedena spolu s interakčními energiemi E a koordinačními čísly Z pro páry báze (b) a screenu (s).

Báze	screen	E_{mix}	E_{bb}	E_{bs}	E_{sb}	E_{ss}	Z_{bb}	Z_{bs}	Z_{sb}	Z_{ss}
PHB	PHB	0.000	-1.583	-1.583	-1.583	-1.583	3.789	3.789	3.789	3.789
PEG	PEG	0.000	-0.693	-0.693	-0.693	-0.693	3.048	3.048	3.048	3.048
PHB	PEG	0.468	-1.583	-1.045	-1.045	-0.693	3.789	3.851	3.017	3.048
PEG	PHB	0.468	-0.693	-1.045	-1.045	-1.583	3.048	3.017	3.851	3.789
PHB	Pyren	2.364	-1.583	-3.289	-3.289	-5.340	3.789	3.772	5.643	5.561
PEG	Pyren	6.584	-0.693	-2.131	-2.131	-5.340	3.048	3.042	5.702	5.561

Nulové hodnoty E_{mix} pro páry PHB-PHB a PEG-PEG ukazují dokonalou mísitelnost, což je pochopitelné, neboť každá látka je neomezeně mísitelná sama se sebou. Páry PHB-PEG a PEG-PHB, u kterých došlo pouze k záměně báze a screenu, mají podle očekávání hodnotu E_{mix} stejnou. Nejdůležitějším výsledkem jsou však hodnoty E_{mix} pro páry PHB-pyren a PEG-pyren, které potvrzují výsledky předchozích výpočtů, tzn. že molekuly pyrenu preferují PHB před PEG.

Na základě výsledků, uvedených v Tabulce 1, jsme se rozhodli dále pracovat s řetězcí typu 24-91-24. Tyto řetězce obsahují 1215 atomů, modely jsou tedy výpočetně méně náročné, než modely obsahující řetězce typu 55-91-55 (1960 atomů), a přitom poskytují srovnatelné výsledky.



Obrázek 9 Základní strukturní jednotky (a) PEG a (b) PHB. Atomy, jimiž na sebe jednotky v řetězci navazují a v jejich blízkosti se tedy molekula pyrenu při výpočtu mísitelnosti objevit nesmí (tzn. *non-contact atoms* – tedy *nekontaktní atomy*), jsou označeny modrými a růžovými kruhy.

3.3. Závislost interakční energie mezi kopolymerním řetězcem a molekulami pyrenu na jejich množství a možnost zjednodušení modelů

V dalším kroku nás zajímal teoreticky nejvyšší počet molekul pyrenu na PHB segmentech. Byl použit řetězec 24-91-24 a na PHB konec bylo umístěno 20, 40, 60 a 80 pyrenů tak, aby každá molekula ležela rovnoběžně s řetězcem, tzn. aby k němu přiléhala

plochou a nikoliv hranou. Tato orientace molekul pyrenu byla zvolena na základě výsledků uvedených v Tabulce 1 a na Obrázku 8 (nejsilnější interakce pyren-PHB). Dále v textu práce bude počet pyrenů připadající na segment PHB v závorce za číslem udávajícím počet jeho monomerů, tzn. obecně $x(n)-y-x(n)$. Byly postaveny řetězce 24(20)-91-24(0), 24(40)-91-24(0), 24(60)-91-24(0), 24(80)-91-24(0) a zároveň byly pro porovnání připraveny modely typu 24(20)-91-24(20), 24(40)-91-24(40) atd. Cílem srovnání bylo zjistit, zda je interakce mezi molekulami pyrenu a segmenty PHB možno studovat pomocí zjednodušených modelů, kde je molekulami pyrenu obsazen pouze jeden segment PHB namísto obou dvou. Všechny tyto modely byly studovány metodou molekulární dynamiky za použití Nosého termostatu [29] a Berendsenova barostatu [30]. Zvolený čas dynamiky byl 2000 ps. Vzhledem k tomu, že jeden časový krok představuje 1.0 fs, celkový počet kroků dynamiky byl $2 \cdot 10^6$. První polovina dynamiky (0 – 1000 ps) sloužila k relaxaci struktury, v druhé polovině dynamiky (1001 – 2000 ps) byla relaxovaná struktura ponechána časovému vývoji. Dynamická trajektorie byla vytvořena ze struktur uložených v průběhu druhé poloviny dynamiky po každém 5000. kroku, celkově tedy bylo k dispozici 101 struktur (tzv. framů), představujících časový vývoj modelu po danou dobu (1001-2000 ps). Všechny výpočty MD probíhaly ve statistickém souboru NVT (tzn. konstantní počet částic, konstantní objem a konstantní teplota) při teplotě 298 K v periodické cele, za použití silového pole Compass. Po skončení dynamiky byly vypočítány hodnoty E_{int} pro každou strukturu, uloženou v průběhu dynamiky. Tyto hodnoty byly získány pomocí dvou přístupů. V prvním přístupu byly uvažovány všechny pyreny obklopující PHB segment. Pro každý frame tak vyšla pouze jedna hodnota E_{int} , která představovala interakci všech pyrenů s řetězcem. Těchto 101 hodnot bylo následně zprůměrováno a poděleno počtem pyrenů tak, aby byla získána průměrná hodnota E_{int} vztažená na jednu molekulu pyrenu. Hodnoty jsou pro každý model uvedeny v Tabulce 3 jako „1. přístup“.

Ve druhém přístupu byl uvažován každý pyren zvlášť vůči řetězci, což vedlo k získání n hodnot (n = počet pyrenů) pro každý frame. Těchto n hodnot E_{int} bylo v rámci každého framu zprůměrováno, takže jsme získali sadu 101 hodnot (jednu pro každý frame). Pro získání průměrné hodnoty E_{int} pro každý z pyrenů po dobu dynamiky bylo těchto 101 hodnot zprůměrováno a výsledná hodnota E_{int} je pro všechny modely uvedena v Tabulce 3 jako „2. přístup“. Důvodem pro použití obou výše uvedených postupů byla potřeba jejich porovnání a zjištění, zda lze druhý, přesnější, přístup nahradit prvním, méně přesným, avšak výpočetně podstatně rychlejším.

Tabulka 3 Hodnoty E_{int} (kcal/mol) mezi molekulami pyrenu a PHB-PEG-PHB řetězci typu 24-91-24 pro všechny modely obsahující pouze jeden PHB segment obsazený molekulami pyrenu. Uvedeny jsou výsledky získané oběma přístupy.

	řetězce PHB-PEG-PHB s různým množstvím pyrenů			
1.přístup	24(20)-91-24(0)	24(40)-91-24(0)	24(60)-91-24(0)	24(80)-91-24(0)
E_{int} max	-23.69	-18.80	-16.89	-9.87
E_{int} prům	-25.97±0.66	-19.95±0.55	-18.16±0.63	-14.70±1.44
E_{int} min	-27.40	-21.43	-19.83	-16.72
2.přístup	24(20)-91-24(0)	24(40)-91-24(0)	24(60)-91-24(0)	24(80)-91-24(0)
E_{nb} max	-23.69	-18.80	-16.89	-12.72
E_{nb} prům	-25.97±0.66	-19.88±0.52	-18.16±0.63	-16.06±0.56
E_{nb} min	-27.40	-21.24	-19.83	-16.72

Z Tabulky 3 je zřejmé, že oba přístupy poskytují stejné výsledky. Lze tedy s výhodou použít jednodušší 1. přístup. V případě modelu 24(80)-91-24(0) se hodnoty E_{int} pro 1. a 2. přístup mírně liší. Tento rozdíl byl zapříčiněn přiblížením druhého, volného PHB segmentu k prvnímu PHB segmentu. Některé pyreny tedy interagovaly s oběma PHB segmenty a z tohoto důvodu je u 2. přístupu hodnota E_{int} nižší.

V Tabulce 4 jsou uvedeny hodnoty E_{int} pro řetězce, které měly obaleny oba PHB segmenty pyreny. Z výsledků je opět zřejmé, že oba přístupy výpočtů poskytují stejné výsledky a mírně nižší hodnoty E_{int} ve druhém přístupu jsou způsobeny opět interakcí některých pyrenů s oběma PHB segmenty.

Tabulka 4 Hodnoty E_{int} (kcal/mol) mezi molekulami pyrenu a PHB-PEG-PHB řetězci typu 24-91-24 pro všechny modely mající oba PHB segmenty obsazené molekulami pyrenu. Uvedeny jsou výsledky získané oběma přístupy.

	řetězce PHB-PEG-PHB s různým množstvím pyrenů			
1.přístup	24(20)-91-24(20)	24(40)-91-24(40)	24(60)-91-24(60)	24(80)-91-24(80)
E_{int} max	-24.41	-18.23	-15.45	-10.13
E_{int} prům	-26.03±0.65	-18.98±0.29	-16.54±0.44	-13.51±0.87
E_{int} min	-27.28	-19.86	-17.41	-14.64
2.přístup	24(20)-91-24(20)	24(40)-91-24(40)	24(60)-91-24(60)	24(80)-91-24(80)
E_{nb} max	-24.41	-18.00	-15.63	-10.56
E_{nb} prům	-26.03±0.65	-18.94±0.28	-16.55±0.44	-13.50±0.86
E_{nb} min	-27.28	-19.33	-17.32	-14.64

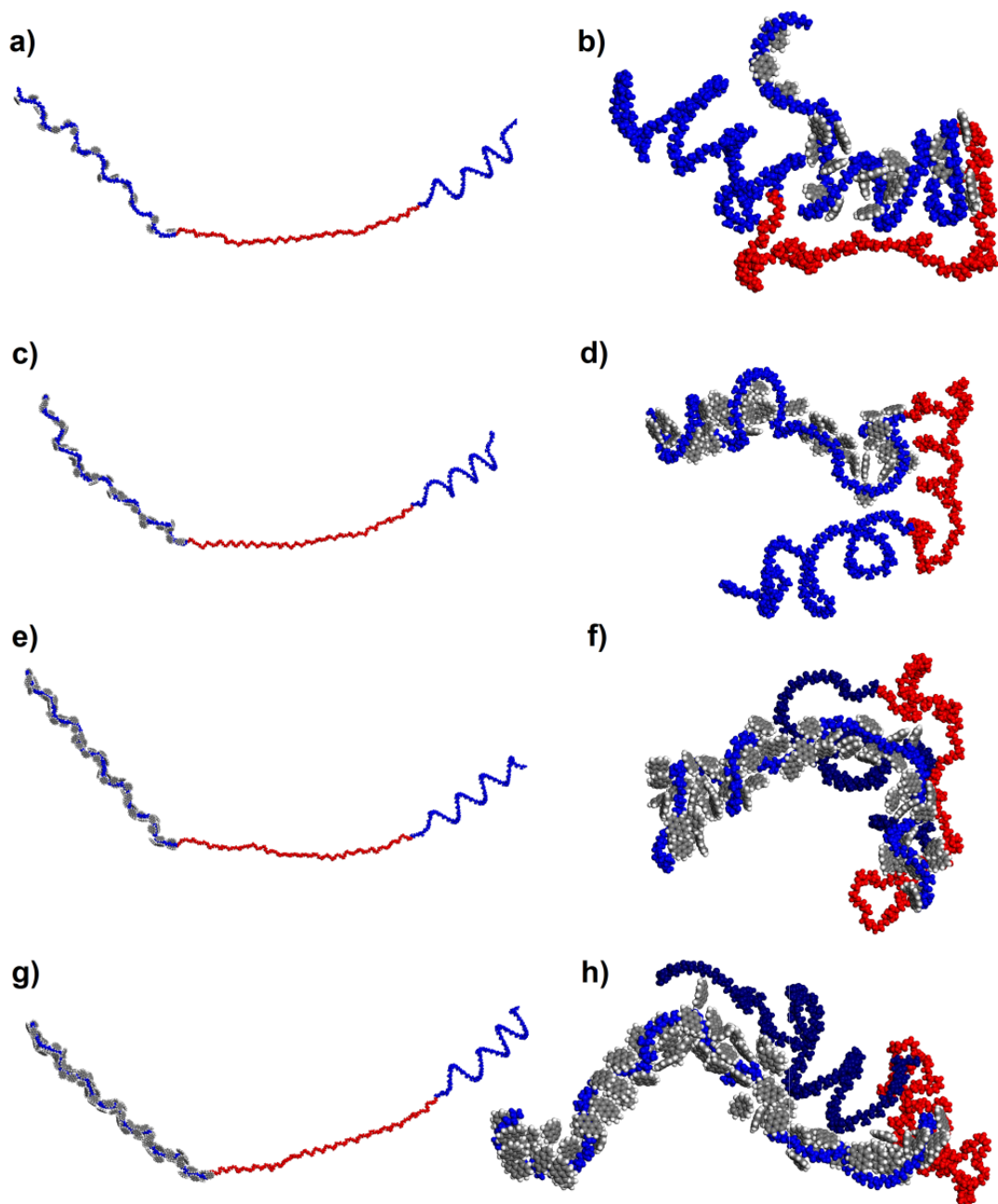
Srovnání hodnot E_{int} modelů s obsazeným pouze jedním PHB segmentem a oběma PHB segmenty (Tabulky 3 a 4) ukazuje, že pro studium interakce mezi molekulami pyrenu a segmenty PHB je možno použít model, ve kterém je molekulami pyrenu obsazen pouze jeden segment PHB namísto obou dvou a také pouze 1. přístup výpočtů. To představuje významnou úsporu výpočetního času. Je třeba mít na paměti, že použití zjednodušeného modelu s pouze jedním obsazeným segmentem PHB poskytuje mírně silnější interakci mezi pyrenem a řetězcem. Rozdíl ve výsledcích se zvyšuje s rostoucím počtem pyrenů, avšak trend zůstává zachován.

Obrázek 10 ukazuje modely uvedené v Tabulce 3 po geometrické optimalizaci (optimalizované modely sloužily jako vstupní modely pro molekulární dynamiku) a po molekulární dynamice (v čase 2000 ps). Stejně jako na Obrázcích 8a, c jsou segmenty PHB modré a segment PEG je červený.

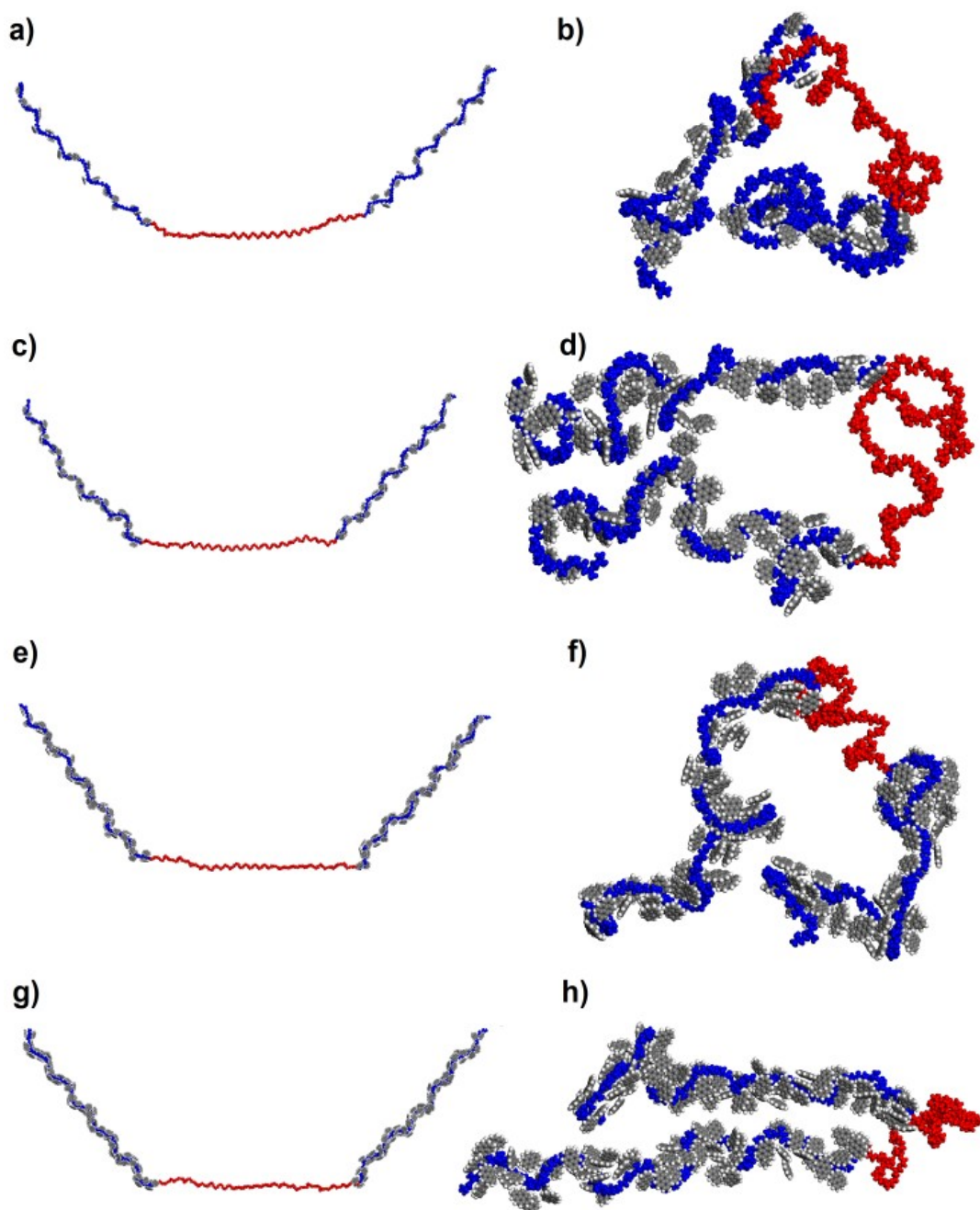
Geometricky optimalizované modely, sloužící jako vstupní modely pro molekulární dynamiku jsou na Obrázcích 10a,c,e,g. Poslední framy z molekulární dynamiky, tedy struktury v čase 2000 ps, jsou na Obrázcích 10b,d,f,h.

Modely s oběma PHB segmenty obalenými molekulami pyrenu (viz Tabulka 4) jsou na Obrázku 11. Stejně jako u Obrázku 10 jsou i zde zobrazeny geometricky optimalizované modely sloužící jako vstupní modely pro molekulární dynamiku (Obrázky 11a,c,e,g) a poslední framy z molekulární dynamiky, tzn. struktury v čase 2000 ps (Obrázky 11b,d,f,h).

Je vidět, že se zvyšujícím se počtem pyrenů dochází k jejich shlukování a některé pyreny již nejsou v přímém kontaktu s řetězcem. To je příčina znatelného poklesu hodnot E_{int} (viz Tabulky 3 a 4). S rostoucím množstvím molekul pyrenu na PHB segmentu klesá míra jeho sbalení, což je nejlépe vidět při srovnání tvarů modelů s obsazenými a neobsazenými PHB segmenty molekulami pyrenu. S tímto souvisí následující krok naší práce.



Obrázek 10 Modely (a) 24(20)-91-24(0), (c) 24(40)-91-24(0), (e) 24(60)-91-24(0), (g) 24(80)-91-24(0) po geometrické optimalizaci. Tytéž modely (b) 24(20)-91-24(0), (d) 24(40)-91-24(0), (f) 24(60)-91-24(0), (h) 24(80)-91-24(0) na konci molekulární dynamiky. Pro lepší rozlišení dvou PHB segmentů v případě jejich zákrytu (f) a (h) byla změněna modrá barva jednoho z nich ztmavena.



Obrázek 11 Modely (a) 24(20)-91-24(20), (c) 24(40)-91-24(40), (e) 24(60)-91-24(60), (g) 24(80)-91-24(80) po geometrické optimalizaci. Tytéž modely (b) 24(20)-91-24(20), (d) 24(40)-91-24(40), (f) 24(60)-91-24(60), (h) 24(80)-91-24(80) na konci molekulární dynamiky.

3.4. Míra sbalení kopolymerního řetězce v závislosti na množství molekul pyrenu a možnost zjednodušení modelů

Jedním ze strukturních faktorů popisujících rigidity polymerních a kopolymerních řetězců je srovnání jejich délky s průměrem kompaktnější struktury vzniklé sbalením řetězce. Zatímco délku řetězce lze snadno změřit, průměr tvaru vzniklého sbalením řetězce je v různých směrech různý. Z tohoto důvodu je výhodné pro stanovení jeho velikosti použít veličinu zvanou gyrační poloměr (R_g), která je udána vzorcem:

$$R_g = \frac{\sqrt{\sum_{i=1}^N (r_i - r_{cm})^2}}{N} \quad (12)$$

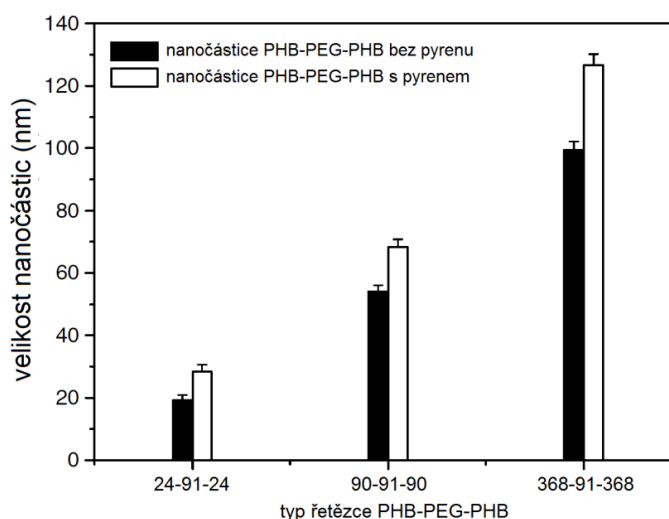
kde r_i udává pozici vektoru každého atomu v řetězci, r_{cm} udává pozici vektoru těžiště celého řetězce a N představuje celkový počet atomů.

V Tabulce 5 jsou uvedeny hodnoty R_g pro všechny řetězce typu 24-91-24 namodelované v předcházejících částech této práce (hodnoty R_g PHB-PEG-PHB). Vzhledem k tomu, že nás zajímala míra stočení řetězce, byly hodnoty R_g PHB-PEG-PHB počítány pouze pro samotný řetězec, nikoliv pro řetězec s pyreny. Ty byly před výpočtem R_g PHB-PEG-PHB z modelu vymazány. Výjimkou je model 24(0)-91-24(0), který byl simulován již od začátku bez molekul pyrenu a sloužil jako model referenční. Hodnoty R_g PHB 1 jsou gyrační poloměry PHB segmentu původně obsazeného pyreny a hodnoty R_g PHB 2 představují gyrační poloměry segmentů PHB původně bez pyrenů. Tyto hodnoty potvrzují, že obalené PHB segmenty pyreny budou vždy „méně sbalené, tedy rovnější“, než PHB segmenty bez pyrenů. Proto jsou hodnoty R_g PHB 1 vždy větší, než hodnoty R_g PHB 2, což je zapříčiněno tím, že pyreny nedovolí řetězci se sbalit. Míru sbalení řetězců s pyreny i bez pyrenů lze vidět na Obrázcích 10b, d, f, h a 11b, d, f, h. Tabulka 5 ukazuje, že v případě výpočtu R_g není možné nahradit model obsahující oba PHB segmenty obsazené molekulami pyrenu za model zjednodušený. Hodnoty R_g pro modely 24(n)-91-24(0) se od modelů 24(n)-91-24(n) významně liší, na rozdíl od výpočtu E_{int} .

Tabulka 5 Srovnání gyračních poloměrů (R_g) jednotlivých řetězců a jejich částí. Hodnoty jsou uváděny v nanometrech.

modely	R_g PHB-PEG-PHB (nm)	R_g PHB 1 (nm)	R_g PHB 2 (nm)
24(0)-91-24(0)	2.40	1.34	1.30
24(20)-91-24(0)	3.52	2.40	2.16
24(20)-91-24(20)	3.57	2.95	2.14
24(40)-91-24(0)	4.10	3.04	2.33
24(40)-91-24(40)	4.84	3.27	3.24
24(60)-91-24(0)	3.68	3.50	2.27
24(60)-91-24(60)	4.80	3.11	3.97
24(80)-91-24(0)	4.30	4.24	2.34
24(80)-91-24(80)	6.02	4.68	4.23

Výsledky byly srovnány s hodnotami naměřenými ve článku Chena a kol. [17]. Se vzrůstající délkou PHB segmentu se hodnoty DLC a DLE zvyšují, což odpovídá možnosti kopolymeru pojmout větší množství léčiva. Tento fakt potvrzuje i graf z článku Chena a kol. [27], ve kterém je uvedena závislost velikosti nanočástic kopolymerů 24-91-24, 90-91-90 a 368-91-368 pro vzorky s pyrenem a bez nich (Obrázek 12). Z tohoto grafu je opět patrné, že velikost nanočástic kopolymeru roste se vzrůstající délkou PHB segmentů. Tyto výsledky jsou ve shodě s hodnotami R_g .



Obrázek 12 Závislost velikosti nanočástic kopolymerů PHB-PEG-PHB na přítomnosti či nepřítomnosti molekul pyrenu v jejich objemu. Přeloženo a upraveno podle originálu uveřejněného v článku Chena a kol. [27].

3.5. Určení množství molekul pyrenu v reálných vzorcích

Dosavadní výpočty byly zaměřeny na zjištění, kde se pyren uchytlí nejlépe, a na maximální možné množství pyrenů na PHB segmentech. Reálně připravené vzorky však obsahují daleko méně pyrenu. V článcích Chena a kol. [17,27] jsou, jak již bylo zmíněno výše, uvedeny hodnoty DLC . Tyto hodnoty jsou $1.4 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ pro řetězce typu 24-91-24, $3.7 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ pro řetězce typu 90-91-90 a $6.7 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ pro řetězce typu 187-91-187. Použitím následujícího vzorce:

$$DLC = \frac{N_p \cdot M_p \cdot 1000}{(N_p \cdot M_p + N_k \cdot M_k)} \quad (13)$$

kde N_p je počet molekul pyrenu, N_k je počet řetězců PHB-PEG-PHB, M_p ($\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$) je molární hmotnost pyrenu a M_k ($\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$) je molární hmotnost PHB-PEG-PHB, lze vypočítat nejen teoretické hodnoty pro námi postavené modely s řetězci 24-91-24, ale také množství pyrenů na jeden řetězec PHB-PEG-PHB pro experimentálně získané hodnoty DLC . Přehledně tyto hodnoty ukazuje Tabulka 6, která zároveň umožňuje představit si, jak „prázdná“ je reálná nanočástice tvořená řetězci typu 24-91-24. Pokud hodnotě $DLC = 1.4 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ odpovídá 0.0565 molekuly pyrenu na jeden řetězec, pak v reálném vzorku připadá jedna molekula pyrenu na 17.7 (tedy cca 18) řetězců typu 24-91-24.

Tabulka 6 Počet molekul pyrenu N_p , odpovídající molární hmotnost pyrenů, počet řetězců PHB-PEO-PHB N_k , odpovídající molární hmotnost řetězců a výsledné hodnoty DLC .

N_p (-)	$N_p \cdot M_p$ ($\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$)	N_k (-)	$N_k \cdot M_k$ ($\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$)	DLC ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)
160	32320	1	8132	798.97
120	24240	1	8132	748.79
80	16160	1	8132	665.24
60	12120	1	8132	598.46
40	8080	1	8132	498.40
20	4040	1	8132	331.91
10	2020	1	8132	198.98
1	202	1	8132	24.24
0.1	20.2	1	8132	2.48
0.0565	11.413	1	8132	1.40

Delší řetězce vedou k následujícím výsledkům. Hodnota $DLC = 3.7 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ pro řetězce typu 90-91-90 odpovídá 0.358 molekuly pyrenu na jeden řetězec, tedy cca tři řetězce na jednu molekulu pyrenu. Hodnota $DLC = 6.7 \text{ mg}\cdot\text{g}^{-1}$ pro řetězce typu 187-91-187 odpovídá

1.207 molekuly pyrenu na jeden řetězec, tedy cca pět řetězců na šest molekul pyrenu. Z toho vyplývá, že můžeme pracovat s modely, které obsahují pouze jednu molekulu pyrenu.

3.6. Možnost zjednodušení modelů nahrazením kopolymerního řetězce kratšími analogy

V předcházejícím kroku jsme se zabývali zjednodušením modelů v rámci počtu pyrenů na řetězec kopolymeru. Následující krok byl zaměřen na možnost zjednodušení modelů zkrácením délky řetězce. Byly tedy postaveny modely analogické řetězci typu 24-91-24, avšak dvakrát a šestkrát kratší. Konkrétně tedy byly připraveny řetězce typu 12-45-12 a 4-15-4. Všechny modely byly nejprve geometricky optimalizovány a poté vystaveny molekulární dynamice za podmínek uvedených v kapitolách 3.1. *Příprava iniciálních modelů a stanovení preferované pozice molekuly pyrenu na kopolymerním řetězci PHB-PEG-PHB* a 3.3. *Závislost interakční energie mezi kopolymerním řetězcem a molekulami pyrenu na jejich množství a možnost zjednodušení modelů* Praktické části této práce. V Tabulce 7 jsou uvedeny všechny typy modelů kopolymerů s patřičným počtem pyrenů, které byly k porovnání namodelovány. Na řetězce poloviční délky (tzn. 12-45-12) bylo umístěno poloviční množství pyrenů, na řetězce šestinové délky (tzn. 4-15-4) bylo umístěno šestinové množství pyrenů. Dále jsou v Tabulce 7 uvedeny průměrné hodnoty E_{int} se směrodatnou odchylkou, maximální a minimální hodnoty E_{int} , které byly naměřeny mezi pyrenem a daným řetězcem v průběhu molekulární dynamiky, a hmotnostní procenta molekul pyrenu v daném modelu. Hodnoty E_{int} byly počítány 1. způsobem (viz kapitola 3.3. *Závislost interakční energie mezi kopolymerním řetězcem a molekulami pyrenu na jejich množství a možnost zjednodušení modelů* Praktické části této práce). Naším cílem bylo porovnat E_{int} kratších modelů s modelem základním, tedy s typem 24-91-24.

V Tabulce 7 lze porovnávat mezi sebou ty modely, které mají stejné hmotnostní procento pyrenů. Mírné odchylky hodnot E_{int} mezi řetězci s obalenými oběma PHB segmenty (24(40)-91-24(40), 24(20)-91-24(20), 12(20)-45-12(20), 12(10)-45-12(10)) a jim odpovídajícími modely s řetězci stejné délky, avšak s obaleným pouze jedním PHB segmentem (24(40)-91-24(0), 24(20)-91-24(0), 12(20)-45-12(0), 12(10)-45-12(0)) jsou způsobeny opět tím, že některé pyreny interagovaly s oběma segmenty PHB.

Tabulka 7 Hodnoty E_{int} (kcal/mol) mezi molekulami pyrenu a PHB-PEG-PHB řetězci typu 24-91-24, 12-45-12 a 4-15-4. Uvedené hodnoty byly vypočteny 1. přístupem.

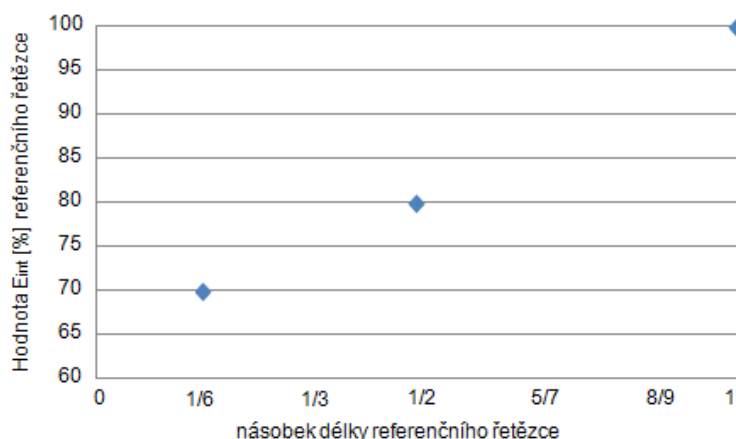
modely	E_{int} max	E_{int} Prům	E_{int} min	hm.% pyrenů
24(40)-91-24(40)	-18.23	-18.98±0.29	-19.56	66.52
12(20)-45-12(20)	-14.10	-14.91±0.32	-15.67	66.64
4(7)-15-4(7)	-14.20	-16.18±0.69	-17.46	67.72
24(60)-91-24(0)	-16.89	-18.16±0.63	-19.83	59.85
4(10)-15-4(0)	-10.82	-12.15±0.58	-13.83	59.98
24(40)-91-24(0)	-18.80	-19.95±0.55	-21.43	49.84
12(20)-45-12(0)	-14.78	-16.10±0.57	-17.21	49.98
24(20)-91-24(20)	-24.41	-26.03±0.65	-27.28	49.84
12(10)-45-12(10)	-18.60	-19.18±0.49	-20.86	49.98
4(3)-15-4(3)	-14.92	-16.61±0.75	-18.99	47.34
24(20)-91-24(0)	-23.69	-25.97±0.66	-27.40	33.19
12(10)-45-12(0)	-19.46	-21.12±0.62	-22.58	33.31
24(10)-91-24(10)	-27.74	-29.74±0.74	-31.36	33.19
12(5)-45-12(5)	-21.54	-23.81 ±0.86	-25.64	33.31

Srovnání hodnot E_{int} řetězců typu 24-91-24 a 12-45-12 se stejně obsazenými segmenty PHB ukazuje víceméně stabilní rozdíl $\sim 20\%$ (významně odlišná hodnota v případě modelů 24(20)-91-24(20) a 12(10)-45-12(10) nebyla vzata v úvahu). Při zkrácení řetězce 24-91-24 na šestinu (tzn. řetězec typu 4-15-4) lze z modelů usuzovat na rozdíl $\sim 30\%$ (významně odlišná hodnota v případě modelů 24(20)-91-24(20) a 12(10)-45-12(10) nebyla vzata v úvahu). Srovnání lze vidět v Tabulce 8. Kratší řetězce typu 4-15-4 vykazují při porovnání s řetězcí typu 24-91-24 větší odchylky v rozdílu E_{int} , než řetězce typu 12-45-12. Důvodem větší odlišnosti je pouze přibližně stejná hodnota hm.% pyrenů.

Tabulka 8 Srovnání hodnot E_{int} referenčního řetězce se zkrácenými řetězci.

referenční řetězec	zkrácený řetězec	E_{int} referenčního řetězce	E_{int} zkráceného řetězce	pokles E_{int} (%)
24(40)-91-24(40)	12(20)-45-12(20)	-18.98	-14.91	21
24(40)-91-24(0)	12(20)-45-12(0)	-19.95	-16.1	19
24(20)-91-24(20)	12(10)-45-12(10)	-26.03	-19.18	26
24(20)-91-24(0)	12(10)-45-12(0)	-25.97	-21.12	19
24(10)-91-24(10)	12(5)-45-12(5)	-29.74	-23.81	20
24(40)-91-24(40)	4(7)-15-4(7)	-18.98	-16.18	15
24(60)-91-24(0)	4(10)-15-4(0)	-18.16	-12.15	33
24(20)-91-24(20)	4(3)-15-4(3)	-23.03	-16.61	28

Větší počet modelů nebyl z časových důvodů připraven a optimalizován, avšak z dostupných dat lze usuzovat na závislost zobrazenou na Obrázku 13.



Obrázek 13 Graf závislosti hodnot E_{int} [%] referenčního řetězce na násobku délky referenčního řetězce.

Na ose x Obrázku 13 jsou násobky délky referenčního řetězce typu 24-91-24. Na ose y jsou uvedeny průměrné hodnoty E_{int} zkrácených řetězců jako % hodnoty E_{int} referenčního řetězce, přičemž odchylky byly diskutovány výše. Jsme si vědomi, že tato závislost je pouze přibližná a v budoucnu bude vyžadovat další zpřesnění ve smyslu (a) více modelů reprezentujících jeden bod v grafu, (b) modely, představující další poměrná zkrácení (třetina, čtvrtina, apod.), tzn. další body v grafu. S vědomím výše uvedeného byl původní řetězec typu 24-91-24 nahrazen řetězcem typu 12-45-12 a 4-15-4. Toto zkrácení modelů značně ušetřilo čas při dalších výpočtech.

3.7. Struktura kopolymerní nanočástice

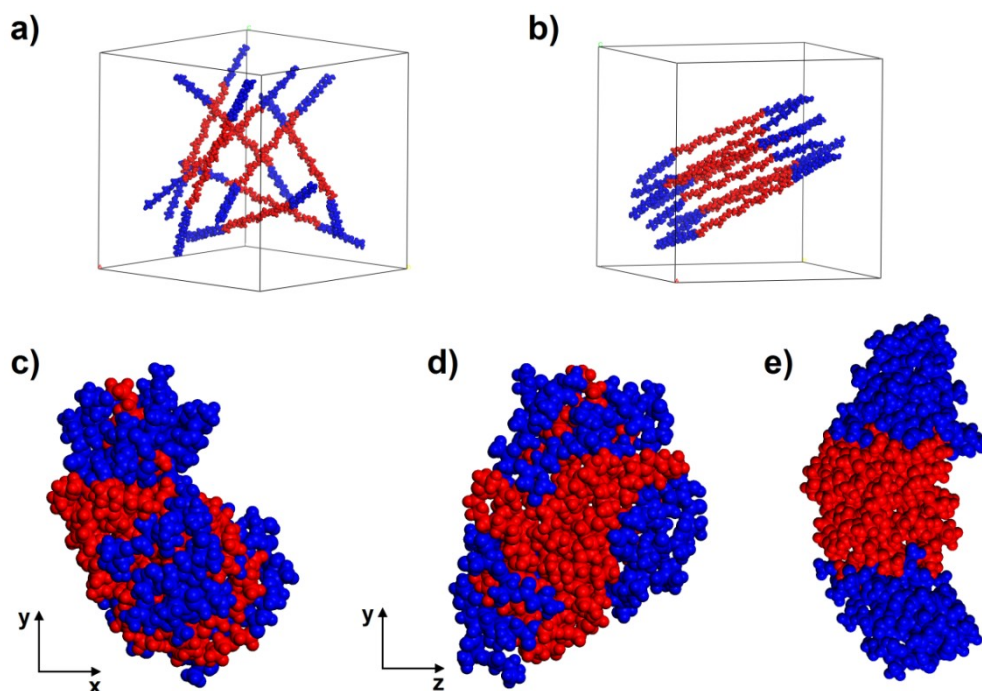
Cílem tohoto kroku bylo zjistit, zda kopolymerní řetězce upřednostňují amorfni či uspořádanou strukturu. V článku Chena a kol. [17,27] je uvedeno, že krystalinita kopolymerů má velký vliv na hodnoty DLC a DLE. Vyšší krystalinita jádra nanočástic kopolymerů snižuje hodnoty DLC a DLE, protože amorfni fáze dokáže pojmout molekuly léčiva lépe, a že PHB blok zabraňuje krystalizaci PEG bloku. Dále je uvedeno, že kopolymery tvoří ve vodném roztoku nanočástice s tak zvanou *core-shell* strukturou. To znamená, že hydrofobní PHB jádro nanočástice je stabilizováno hydrofilním PEG obalem. Ke zjištění, jak se kopolymer uspořádá a jaký tvar ve vodě zaujme, bylo nutné vybrat model obsahující co největší počet řetězců. Kvůli časové náročnosti byl vybrán model typu 4-15-4. K výpočtům byly postaveny dva modely. V prvním modelu bylo osm řetězců

typu 4-15-4 rozmístěno v periodické cele ($9.5 \times 9.5 \times 9.5$ nm) nahodile, ve druhém modelu bylo osm řetězců typu 4-15-4 umístěno v cele stejné velikosti rovnoběžně. Tyto iniciální modely jsou na Obrázku 14a,b. Cílem výpočtů bylo na základě hodnot E_{tot} rozhodnout, zda je pro řetězce energeticky výhodnější vytvořit nanočástici amorfni nebo uspořádanou. Výsledné hodnoty E_{tot} optimalizovaných modelů jsou uvedeny v Tabulce 9.

Tabulka 9 Srovnání E_{tot} (kcal/mol) modelů s osmi řetězci typu 4-15-4.

model	uspořádání řetězců	iniciální objem cely (nm ³)	E_{tot} (kcal/mol)
8(4-15-4)	rovnoběžně	857,38	-3044.18
8(4-15-4)	nahodile	857.38	-2972.53
8(4-15-4)	rovnoběžně	27000	-1685.49
8(4-15-4)	nahodile	27000	-1699.39

Ze srovnání hodnot E_{tot} modelů v počáteční cele je patrné, že E_{tot} optimalizovaného modelu s rovnoběžně uspořádanými kopolymery je nižší, a tedy energeticky výhodnější. Nicméně, hodnoty E_{tot} obou modelů jsou prakticky srovnatelné (rozdíl činí ~ 2.4 %), takže v tomto případě nebylo energeticky výhodnější uspořádání kopolymerních řetězců nalezeno. Možnou příčinou je malá velikost cely, která vzhledem k periodicitě zabraňuje případnému přeuspořádání řetězců. Z tohoto důvodu jsme se rozhodli přenést modely do větší periodické cely $30 \times 30 \times 30$ nm. Modely byly geometricky optimalizovány a následně vystaveny MD za stejných podmínek, jako při výpočtech v kapitolách 3.1. *Příprava iniciálních modelů a stanovení preferované pozice molekuly pyrenu na kopolymerním řetězci PHB-PEG-PHB* a 3.3. *Závislost interakční energie mezi kopolymerním řetězcem a molekulami pyrenu na jejich množství a možnost zjednodušení modelů*. Hodnoty E_{tot} těchto nových modelů ve větší cele jsou uvedeny na spodních dvou řádcích Tabulky 9. Nižší E_{tot} tentokrát patří modelu s nahodile uspořádanými kopolymerními řetězci, nicméně hodnoty E_{tot} jsou opět u obou modelů srovnatelné (rozdíl činí ~ 0.8 %). Oba modely jsou na Obrázku 14. Model s náhodně uspořádanými řetězci je ukázán ze dvou stran (Obrázek 14c,d), model s rovnoběžně uspořádanými řetězci vypadal ze všech stran stejně (Obrázek 14e). Takže ani po MD nebylo preferováno žádné počáteční postavení kopolymerů v cele. Studovány byly tedy dále oba typy postavení.



Obrázek 14 Iniciální modely řetězců typu 4-15-4 v náhodném (a) a rovnoběžném (b) uspořádání. Finální modely z cely $30 \times 30 \times 30$ nm ukazují výsledný tvar náhodně uspořádaných (c) a (d) a rovnoběžně uspořádaných řetězců (e). Segmenty PHB jsou modré, segmenty PEG jsou červené.

3.8. Uchycení pyrenu

V následujícím kroku jsme se zaměřili na nalezení místa, kam se pyren představující hydrofobní léčivo uchytí nejlépe. Na základě výsledků z předcházejících výpočtů bylo očekáváno, že pyren bude nejlépe vázán v oblasti PHB segmentů (viz Tabulka 1, Obrázek 8). V tomto kroku bylo cílem zajistit alespoň přibližnou simulaci reálného vzorku s využitím všech zjednodušení, které byly v průběhu práce otestovány.

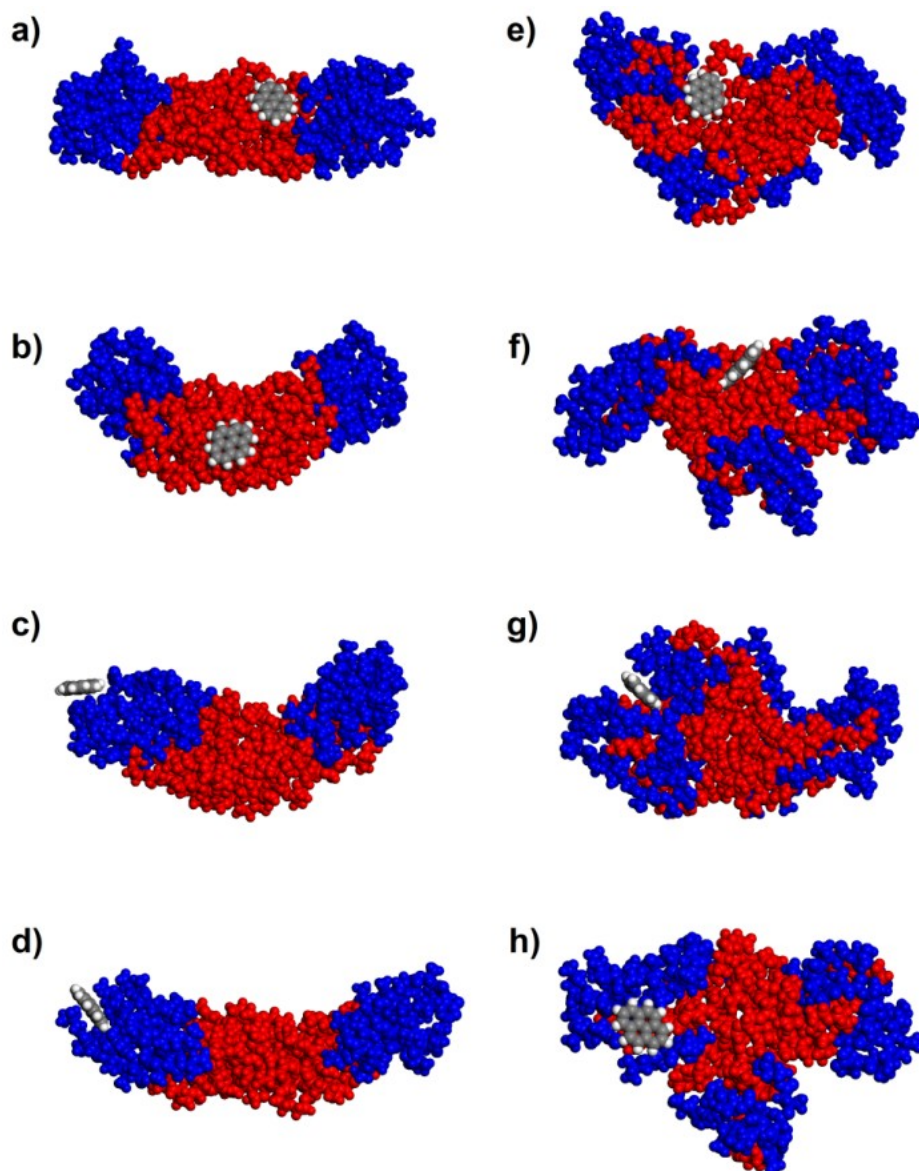
K tomuto účelu bylo postaveno osm modelů s řetězci typu 4-15-4, které neobsahovaly vodu. Do modelu 8(4-15-4) s rovnoběžně postavenými řetězci v periodických buňkách $30 \text{ nm} \times 30 \text{ nm} \times 30 \text{ nm}$ byla přidána molekula pyrenu a) plochou k PEG uprostřed klastru, b) plochou k PEG uprostřed z druhé strany klastru, c) plochou mezi PEG a PHB na okraji klastru a d) plochou k PHB. Do modelu 8(4-15-4) s nahodile uspořádanými řetězci v periodických buňkách $30 \text{ nm} \times 30 \text{ nm} \times 30 \text{ nm}$ byla přidána molekula pyrenu a) plochou k PEG uprostřed klastru, b) plochou k PEG uprostřed z druhé strany klastru, c) plochou k PHB na okraji klastru, d) plochou k PHB na okraji z druhé strany klastru. Všechny tyto modely byly vystaveny GO a MD za podmínek zmíněných v kapitolách 3.1. *Příprava iniciálních modelů a stanovení preferované pozice molekuly pyrenu na kopolymerním*

řetězci PHB-PEG-PHB a 3.3. Závislost interakční energie mezi kopolymerním řetězcem a molekulami pyrenu na jejich množství a možnost zjednodušení modelů Praktické části. Hodnoty E_{int} počítané 1. způsobem z výsledných modelů (viz Obrázek 15) jsou uvedeny v Tabulce 10, která dále shrnuje typy a počty (N) funkčních skupin v blízkosti molekuly pyrenu. V potaz byly brány pouze ty funkční skupiny, jejichž vzdálenost od molekuly pyrenu byla ≤ 0.5 nm. Vzdálenost (d) byla měřena od středu uhlíkového atomu dané funkční skupiny k nejbližšímu uhlíkovému atomu molekuly pyrenu.

Tabulka 10 Hodnoty E_{int} modelů 8(4-15-4) po GO a MD počítané 1. způsobem. N vyjadřuje počet funkčních skupin, d vyjadřuje vzdálenost od středu uhlíkového atomu dané funkční skupiny k nejbližšímu uhlíkovému atomu molekuly pyrenu vyjádřené v nanometrech.

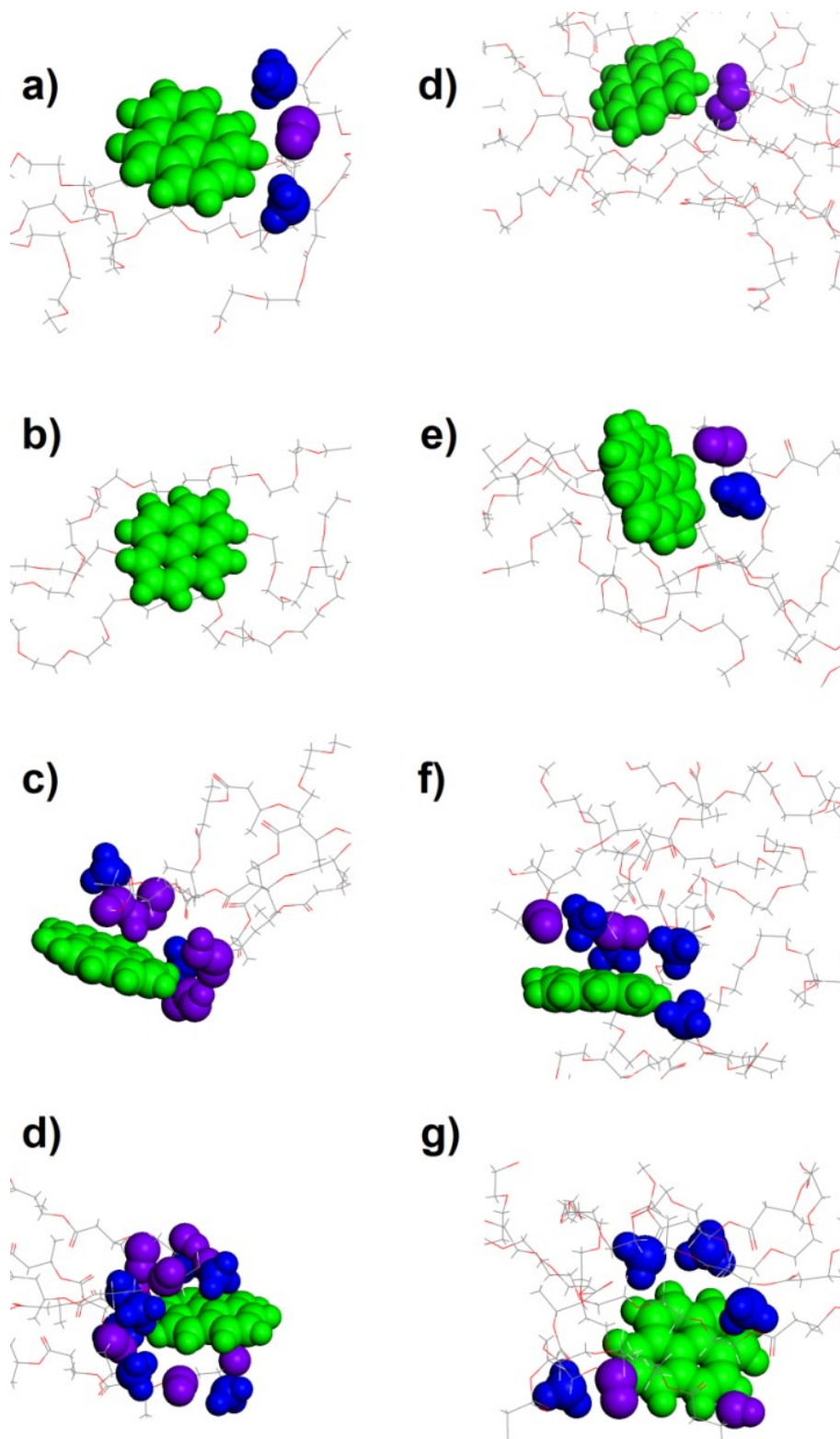
model	E_{int}	N_{COOH}	N_{CO}	N_{CH_3}	d_{COOH} (nm)	d_{CO} (nm)	d_{CH_3} (nm)
8(4-15-4) rov a	-12.93	0	1	2	-	0.39	0.41
8(4-15-4) rov b	-19.75	0	0	0	-	-	-
8(4-15-4) rov c	-16.38	3	1	2	0.39	0.42	0.48
8(4-15-4) rov d	-22.22	0	8	7	-	0.40	0.40
8(4-15-4) nah a	-24.72	1	0	0	0.38	-	-
8(4-15-4) nah b	-18.07	0	1	1	-	0.37	0.44
8(4-15-4) nah c	-25.99	0	2	4	-	0.38	0.39
8(4-15-4) nah d	-23.77	0	2	4	-	0.37	0.41

Z Tabulky 10 vyplývá, že v modelu typu 8(4-15-4) rov se nejsilněji pyren uchytí v případě *d*, kdy byl uložen plochou k PHB. U modelu s nahodile uspořádanými řetězci kopolymeru odpovídá nejzápornější hodnota E_{int} modelu 8(4-15-4) nah c. V obou modelech (viz Obrázek 15d,g) je molekula pyrenu jakoby sevřena v kleštích mezi segmenty PHB. Zároveň je patrné, že v obou případech uspořádání řetězců (tzn. nahodilé i rovnoběžné) se nejslabší interakce objevila u modelů, kdy molekula pyrenu leží v oblasti segmentů PEG. Průměrné hodnoty E_{int} , spočítané ze všech čtyř modelů pro daná uspořádání řetězců, jsou -17.82 kcal/mol (rovnoběžné uspořádání) a -23.14 kcal/mol (nahodilé uspořádání). Tento výsledek je v dobrém souhlasu s tvrzením v článkách Chena a kol. [17,27] o vlivu krystalinity kopolymerů na hodnoty DLC a DLE. Hodnoty E_{int} ukazují, že molekuly pyrenu se skutečně vážou silněji na amorfnní kopolymerní klastr, než na klastr tvořený uspořádanými kopolymerními řetězci.



Obrázek 15 Finální modely *8(4-15-4) rov* (a), (b), (c) a (d) a *8(4-15-4) nah* (e), (f), (g) a (h). Segmenty PHB jsou modré, segmenty PEG jsou červené. Molekula pyrenu je zobrazena pomocí standardních barev, tzn. atomy uhlíku jsou šedé, atomy vodíku jsou bílé.

Na Obrázku 16 jsou zvýrazněny funkční skupiny na polymerních řetězcích v blízkosti molekuly pyrenu. Srovnáním s Tabulkou 10 lze vypočítat, že hodnota E_{int} souvisí se vzdáleností funkčních skupin od molekuly pyrenu. Počet funkčních skupin naproti tomu není určujícím faktorem pro hodnoty E_{int} . Srovnání hodnot E_{int} s počtem různých funkčních skupin v blízkosti pyrenu ukazuje zvýšení počtu skupin CO a CH₃ v případě silnější interakce mezi kopolymerem a pyrenem. Skupin CH₃ je přitom průměrně $\sim 1.5\times$ více, než skupin CO. Tento trend není příliš výrazný a pro lepší potvrzení bude zapotřebí prostudovat více modelů.



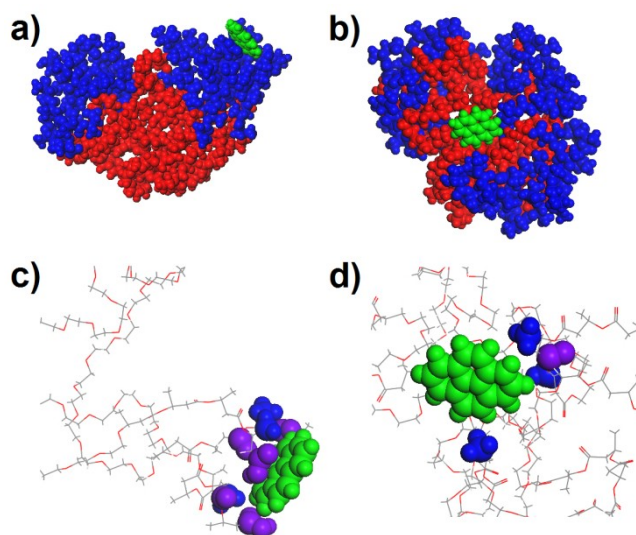
Obrázek 16 Stejné modely stejně rozložené jako na Obrázku 15, avšak zvýrazněny jsou pouze funkční skupiny z polymerních řetězců v blízkosti molekuly pyrenu. Molekula pyrenu je zelená, skupiny COOH a CO jsou fialové, skupina CH₃ je modrá. Zbylé části řetězců zobrazené jako linie mají standardní barvy, tzn. atomy uhlíku jsou šedé, atomy kyslíku jsou červené. Bílé atomy vodíku nejsou na pozadí vidět.

3.9. Modely s vodou i pyrenem

Pro simulaci chování vzorku s vodou i pyrenem dohromady byly vybrány (na základě výsledků získaných v minulém kroku) dva modely s nahodile resp. rovnoběžně uspořádanými řetězci. Konkrétně se jednalo o modely s nejsilnější interakcí mezi pyrenem a kopolymerními řetězci, tzn. modely *8(4-15-4) nah c* a *8(4-15-4) rov d* (viz Tabulka 10 a Obrázky 15d,g). Do periodické buňky $30\text{ nm} \times 30\text{ nm} \times 30\text{ nm}$ bylo přidáno 1855 molekul H_2O (což představuje 75 hm. % vody) a jedna molekula pyrenu. Oba modely byly vystaveny GO a MD, přičemž docházelo také k optimalizaci cely. Výsledné modely (poslední framy MD) jsou ukázány na Obrázku 17, hodnoty E_{int} spolu s počty funkčních skupin a jejich vzdálenostmi od molekuly pyrenu shrnuje Tabulka 11.

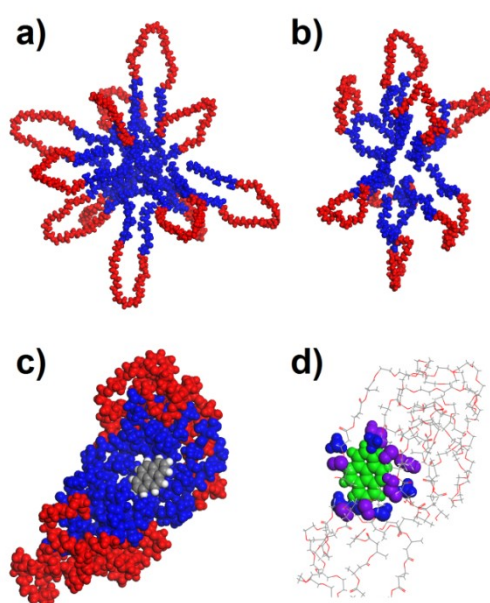
Tabulka 11 Hodnoty E_{int} modelů *8(4-15-4)* po GO a MD počítané 1. způsobem. N vyjadřuje počet funkčních skupin, d vyjadřuje vzdálenost od středu uhlíkového atomu dané funkční skupiny k nejbližšímu uhlíkovému atomu molekuly pyrenu vyjádřené v nanometrech.

model	E_{int}	N_{COOH}	N_{CO}	N_{CH_3}	d_{COOH}	d_{CO}	d_{CH_3}
<i>8(4-15-4) rov d</i>	-18.8722	2	3	3	0.33	0.42	0.44
<i>8(4-15-4) nah c</i>	-40.0557	0	1	3	-	0.42	0.44
<i>8(4-15-4) klastr</i>	-21.9751	3	4	6	0.45	0.41	0.41



Obrázek 17 Modely *8(4-15-4) rov d* (a) a *8(4-15-4) nah c* (b) po GO a MD s vodou (75 hm.%). Molekula pyrenu je zelená, segmenty PHB jsou modré, segmenty PEG jsou červené. Modely *8(4-15-4) rov d* (c) a *8(4-15-4) nah c* (d) se zvýrazněnými funkčními skupinami z polymerních řetězců v blízkosti molekuly pyrenu. Molekula pyrenu je zelená, skupiny COOH a CO jsou fialové, skupina CH_3 je modrá. Zbylé části řetězců na obrázcích (c) a (d) jsou zobrazené jako linie se standardními barvami, tzn. atomy uhlíku jsou šedé, atomy kyslíku jsou červené. Bílé atomy vodíku nejsou na pozadí vidět.

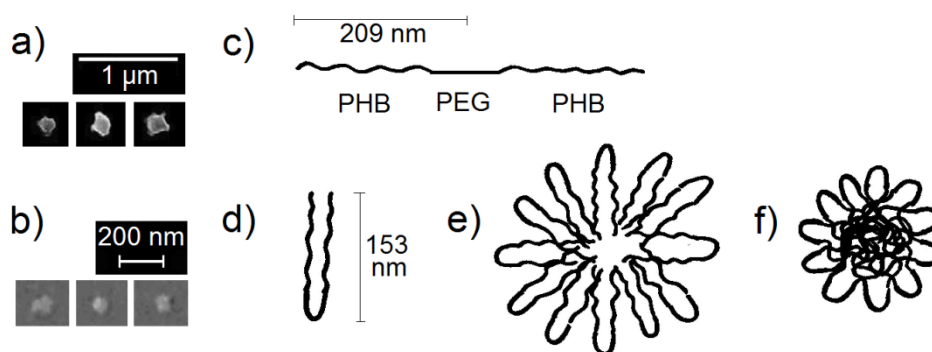
Články Chena a kol. [17,27] uvádí představu autorů o uspořádání kopolymerního klastru s hydrofobním jádrem tvořeným segmenty PHB a hydrofilním obalem tvořeným segmenty PEG. Vzhledem ke tvaru a uspořádání PHB-PEG-PHB řetězců to znamená, že Chen a kol. předpokládají řetězce ohnuté tak, aby se segmenty PHB stýkaly. Podobné uspořádání bylo pozorováno v případě modelů s jedním či oběma obsazenými segmenty PHB (viz Obrázky 10 a 11). Jelikož v našich modelech s více řetězci jsme samovolné uspořádání tohoto typu nepozorovali (důvodem může být např. krátký čas, krátké řetězce apod.), rozhodli jsme se na závěr této práce cíleně takovouto strukturu připravit. Použili jsme osm řetězců typu 4-15-4 a vyrobili jsme z nich klastr přibližně kulového tvaru (viz Obrázek 18a). Hodnota E_{tot} jednoho takto ohnutého kopolymerního řetězce je -297.5 kcal/mol, hodnota E_{tot} pro celý klastr z osmi řetězců (po GO a MD) je -4818.7 kcal/mol, tzn. struktura je stabilní (viz Obrázek 18b). Takovému uspořádání ohnutých řetězců do klastru je tedy možné.



Obrázek 18 Iniciální model klastru (a), model klastru po MD (b), model klastru s vodou a pyrenem po MD (c) a model klastru stejný jako (c), avšak se zvýrazněnými funkčními skupinami z polymerních řetězců v blízkosti molekuly pyrenu. Molekula pyrenu je zelená, skupiny COOH a CO jsou fialové, skupina CH₃ je modrá. Zbylé části řetězců zobrazené jako linie mají standardní barvy, tzn. atomy uhlíku jsou šedé, atomy kyslíku jsou červené. Bílé atomy vodíku nejsou na pozadí vidět.

Do středu klastru jsme umístili jednu molekulu pyrenu, klastr s pyrenem byl vložen do cely 30×30×30 nm spolu s 1855 molekulami H₂O (představuje 75 hm.% vody) a následně byla spuštěna GO a MD. Výsledný model je na Obrázku 18c, přičemž funkční skupiny

interagující s pyrenem jsou zobrazeny na Obrázku 18d. Je vidět, že řetězce udržely svůj tvar (zůstaly ohnuté segmenty PHB k sobě), avšak seskládaly se k sobě, takže nelze říci, že by byl vytvořen klastr se zřetelným hydrofobním jádrem a hydrofilním obalem. K simulaci takového klastru je tedy zapotřebí více řetězců, pravděpodobně delších řetězců, adekvátně tomu i větší množství molekul H_2O , a také silnější výpočetní síla. Na závěr této práce byl učiněn pokus o představu uspořádání reálné nanočástice. Na základě fotografií ze skenovacího elektronového mikroskopu v článcích Chena a kol. [17,27] je možné stanovit poloměr částic kopolymerního nosiče s molekulami pyrenu. Průměrná hodnota průměru částic na fotografii v [27] (Figure 6) je ~ 180 nm, na fotografii v [17] (Figure 3) je ~ 80 nm (Obrázek 19a,b). Tyto reálné vzorky obsahují řetězce typu 368-91-368. V naší práci jsme s takto dlouhými řetězci nepracovali, takže byl postaven model jednoho řetězce typu 368-91-368. Polovina délky tohoto řetězce měřená v iniciálním modelu (tzn. rovný řetězec) je ~ 209 nm (schéma na Obrázku 19c). Po GO a MD dochází ke zkroucení řetězce a jeho poloviční délka je ~ 153 nm (schéma na Obrázku 19d). Je zřejmé, že řetězce této délky nemohou tvořit nanočástici, v níž jsou PHB segmenty v jádře uspořádány víceméně rovně a rovnoběžně se segmenty sousedního řetězce ($2 \times 153 > 180$, resp. 80), viz Obrázek 19e. Pro snížení průměru nanočástice na hodnotu ~ 180 nm (resp. ~ 80 nm) musí být PHB segmenty silně zkroucené, čímž se jádro micely stává amorfním, za předpokladu hydrofilního obalu a hydrofobního jádra (Obrázek 19f).



Obrázek 19 (a) fotografie nanočástic reálných vzorků s řetězcí 368-91-368 z článku [27], (b) fotografie nanočástic reálných vzorků s řetězcí 368-91-368 z článku [17], (c) poloviční délka iniciálního modelu řetězce 368-91-368, (d) délka optimalizovaného řetězce 368-91-368, (e) nepravděpodobné uspořádání nanočástice, (f) pravděpodobné uspořádání nanočástice.

Tato úvaha je jednoduchým příkladem toho, jak znalost rozměru kopolymerního řetězce může vést k představě o uspořádání nanočástice, avšak přímé potvrzení této úvahy, tzn. model nanočástice, nespadá do tématu této práce a navíc se jedná o časově extrémně náročný výpočet.

4. Závěr

Na začátku mé bakalářské práce jsem vypracovala literární rešerši, přečetla doporučenou literaturu a seznámila se se základy práce v modelovacím prostředí Materials Studio. Na základě modelů obsahujících různé poměry kopolymerních řetězců PHB-PEG-PHB a molekul pyrenu lze učinit následující závěry.

Molekula pyrenu přednostně zaujímá místo poblíž PHB segmentů a s rostoucí délkou PHB segmentu je interakce pyren-PHB silnější. Tyto výsledky jsou ve shodě s výsledky z článku Chena a kol. [17], kde bylo zjištěno lepší uchycení pyrenu na hydrofobním jádře (složeném z PHB segmentů) a možnost vyššího nasycení kopolymeru pyrenem s rostoucí délkou PHB segmentů. Také výpočty vzájemné mísitelnosti potvrdily, že molekula pyrenu se s PHB mísí lépe, než s PEG.

Srovnáním dvou různě náročných variant výpočtu interakční energie (E_{int}) mezi pyrenem a kopolymerním řetězcem bylo zjištěno, že oba přístupy poskytují stejné výsledky, což umožnilo hodnoty E_{int} počítat jednodušším a časově méně náročným přístupem. Pro výpočet míry obsazenosti segmentů PHB molekulami pyrenu lze brát v úvahu interakci pyrenu s pouze jedním segmentem PHB. Hodnoty gyračních poloměrů (R_g) ukázaly, že přítomnost pyrenů na kopolymerním řetězci brání jeho zkroucení.

Ukázalo se, že výpočty lze zjednodušit použitím zkrácených řetězců a odpovídajícím sníženým počtem pyrenů na těchto řetězcích. Takto zjednodušené modely vykazují stabilní rozdíl v hodnotách E_{int} vůči modelům obsahujícím řetězec referenční délky. Molekulární modelování potvrdilo tvrzení v článcích Chena a kol. [17,27], že krystalinita kopolymerů negativně ovlivňuje množství uchycených molekul pyrenů a že amorfní fáze dokáže pojmout molekuly lépe.

Co se celkové morfologie skutečných nanočástic týče, výsledky z poslední části práce ukazují, že zjednodušené modely nelze pro její studium použít. Modely lze zjednodušit pro potřeby výpočtu E_{int} , avšak struktura srovnatelná s pozorováním pomocí skenovacího elektronového mikroskopu nemůže být získána v rozumném čase s použitím modelů obsahujících řádově tisíce atomů a méně.

Reference

- [1] Belgie. DOPORUČENÍ KOMISE ze dne 18. října 2011 o definici nanomateriálu (Text s významem pro EHP). In: *Úřední věstník Evropské unie*. Brusel, 2011, s. 38-40. Dostupné z: <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/CS/TXT/PDF/?uri=CELEX:32011H0696&from=EN>.
- [2] PRNKA, T. a K. ŠPERLING. *BIONANOTECHNOLOGIE, NANOBIOTECHNOLOGIE, NANOMEDICÍNA*. Repronis Ostrava, 2006. ISBN 80-7329-134-7. Dostupné z: <http://www.nanotechnologie.cz/storage/nanotechnologie/200610.pdf>.
- [3] HADAŠOVÁ, E. Lipozomální lékové formy. *Remedia* [online]. 2006, č. 4, s. 433-437 [cit. 2015-05-03]. Dostupné z: <http://www.remédia.cz/Clanky/Lekove-formy / Lipozomalni-lekove-formy/6-H-gC.magarticle.aspx>.
- [4] HENDRICKSON, J. B. Molecular Geometry. I. Machine Computation of the Common Rings. *J. Am. Chem. Soc.* [online]. 1961, roč. 83, č. 22, s. 4537–4547 [cit. 2015-05-03]. DOI: 10.1021/ja01483a011. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ja01483a011>.
- [5] FRANCOEUR, E. Cyrus Levinthal, the Kluge and the origins of interactive molecular graphics. *Endeavour* [online]. 2002, roč. 26, č. 4, s. 127–131 [cit. 2015-05-03]. DOI: 10.1016/S0160-9327(02)01468-0. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0160932702014680>.
- [6] RICHON, A. B. An early history of the molecular modeling industry. *Drug Discovery Today* [online]. 2008, roč. 13, č. 15-16, s. 659–664 [cit. 2015-05-03]. DOI: 10.1016/j.drudis.2008.03.012. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1359644608000895?np=y>.
- [7] DUCHÁČEK, V. *Polymery: výroba, vlastnosti, zpracování, použití*. 3. přeprac. vyd. Praha: VŠCHT, 2011, 276 s. ISBN 978-80-7080-788-0.
- [8] MLEZIVA, J. a J. ŠŇUPÁREK. *Polymery - výroba, struktura, vlastnosti a použití*. 2. přeprac. vyd. Praha: Sobotáles, 2000, 537 s. ISBN 80-85920-72-7.

[9] ŘÍHOVÁ, B. Polymerní cytostatika: Krok k uskutečnění Ehrlichovy „kouzelné střely“. *Přírodovědecký časopis Vesmír* [online]. 2003, č. 82, s. 498-500 [cit. 2015-03-11]. Dostupné z: <http://casopis.vesmir.cz/clanek/polymerni-cytostatika>.

[10] HRUBÝ, M., J. KUČKA, J. KOZEMPEL a O. LEBEDA. Cílené polymerní nosiče léčiv v terapii nádorových onemocnění. *Chemické listy*. 2005, č. 100, s. 10-16. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2006_01_10-16.pdf.

[11] TRUNKÁTOVÁ, A. *Polymerní nosiče léčiv*. Zlín, 2009. Dostupné z: https://dspace.k.utb.cz/bitstream/handle/10563/9801/trunk%C3%A1tov%C3%A1_2009_bp.pdf?sequence=1. Bakalářská práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně. Vedoucí práce doc. Ing. Stanislav Kafka, CSc.

[12] STUHLÍK, P. *Polymery jako konstrukční materiály*. Zlín, 2011. Dostupné z: https://dspace.k.utb.cz/bitstream/handle/10563/18081/stuhl%C3%ADk_2011_bp.pdf?sequence=1. Bakalářská práce. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně. Vedoucí práce doc. Ing. Miroslav Maňas, CSc.

[13] Chemistry in its element: compounds: Polyhydroxybutyrate. *Royal Society of Chemistry* [online]. 2011 [cit. 2015-05-03]. Dostupné z: <http://www.rsc.org/chemistryworld/podcast/CIEcompounds/transcripts/polyhydroxybutyrate.asp>.

[14] CHAIJAMRUS, S. a N. UDPUAY. Production and Characterization of Polyhydroxybutyrate from Molasses and Corn Steep Liquor produced by *Bacillus megaterium* ATCC 6748. *Agricultural Engineering International: the CIGR Ejournal* [online]. 2008, č. 10, s. 1-12 [cit. 2015-05-03]. Dostupné z: <http://www.cigrjournal.org/index.php/Ejournal/article/viewFile/1216/1074>.

[15] Material Safety Data Sheet: Polyethylene glycol (PEG 8000). *BioWorld* [online]. 2015 [cit. 2015-05-04]. Dostupné z: <http://www.bio-world.com/site/accounts/masterfiles/MSDS/MS-41600048.pdf>.

[16] Material Safety Data Sheet: Pyrene MSDS. *ScienceLab.com* [online]. 2015 [cit. 2015-05-04]. Dostupné z: <http://www.sciencelab.com/msds.php?msdsId=9924760>.

[17] CHEN, Ch., Ch. H. YU, Y. Ch. CHENG, P. H. F. YU a M. K. CHEUNG. Biodegradable nanoparticles of amphiphilic triblock copolymers based on poly(3-hydroxybutyrate) and poly(ethylene glycol) as drug carriers. *Biomaterials* [online]. 2006,

roč. 27, č. 27, s. 4804–4814 [cit. 2015-04-05]. DOI: 10.1016/j.biomaterials.2006.04.039. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0142961206004364>.

[18] HUML, K. a J. VONDRÁŠEK. Tři přístupy k počítačovému modelování struktury a interakcí velkých molekul. *Materials structure* [online]. 2000, roč. 7, č. 1, s. 10-15 [cit. 2015-03-11]. Dostupné z: <http://www.xray.cz/ms/bul2000-1/huml.pdf>.

[19] HINCHLIFFE, A. *Molecular Modelling for Beginners* [online]. 2. přeprac. vyd. 2008 [cit. 2015-03-11]. ISBN 978-0-470-51314-9. Dostupné z: <http://www.fis.unam.mx/~ramon/CursoDF/Material%20Didactico/LIBROS/Molecular%20Modelling%20for%20Beginners.pdf>.

[20] RAPPÉ, A. K., C. J. CASEWIT, K. S. COLWELL, W. A. GODDARD III a W. M. SKIFF. UFF, a Full Periodic Table Force Field for Molecular Mechanics and Molecular Dynamics Simulations. *J.Am.Chem.Soc.* [online]. 1992, roč. 114, č. 25, s. 10024-10035 [cit. 2015-03-11]. DOI: 10.1021/ja00051a040. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ja00051a040?journalCode=jasat>.

[21] RIGBY, D., H. SUN a B. E. EICHINGER. Computer simulations of poly(ethylene oxide): force field, pvt diagram and cyclization behaviour. *Polymer International* [online]. 1997, roč. 44, č. 3, s. 311-330 [cit. 2015-05-04]. DOI: 10.1002/(SICI)1097-0126(199711)44:3<311::AID-PI880>3.0.CO;2-H. Dostupné z: [http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/\(SICI\)1097-0126\(199711\)44:3%3C311::AID-PI880%3E3.0.CO;2-H/abstract](http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/(SICI)1097-0126(199711)44:3%3C311::AID-PI880%3E3.0.CO;2-H/abstract).

[22] SUN, H. COMPASS: An ab Initio Force-Field Optimized for Condensed-Phase Applications Overview with Details on Alkane and Benzene Compounds. *J. Phys. Chem. B* [online]. 1998, roč. 102, č. 38, s. 7338–7364 [cit. 2015-05-04]. DOI: 10.1021/jp980939v. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jp980939v>.

[23] SUN, H., P. REN a J.R. FRIED. The COMPASS force field: parameterization and validation for phosphazenes. *Computational and Theoretical Polymer Science* [online]. 1998, roč. 8, č. 1-2, s. 229-246 [cit. 2015-05-04]. DOI: 10.1016/S1089-3156(98)00042-7. Dostupné z: http://ac.els-cdn.com/S1089315698000427/1-s2.0-S1089315698000427-main.pdf?_tid=ca5e5084-f26f-11e4-831d-00000aabb0f26&acdnat=1430752447_592ef69691083625b2e5dbdbce9ebf90.

[24] FLORY, P. J. *Principles of Polymer Chemistry* [online]. 1953 [cit. 2015-05-04]. ISBN 0-8014-0134-8. Dostupné z: https://books.google.cz/books?hl=cs&lr=&id=CQ0EbEkT5R0C&oi=fnd&pg=PR5&dq=Flory+PJ+1995+Principles+of+polymer+chemistry&ots=15uUdSEmgu&sig=SWvrPciiDFvI0v2LgYXJ1G9rFAo&redir_esc=y#v=onepage&q&f=false.

[25] BLANCO, M. Molecular silverware. I. General solutions to excluded volume constrained problems. *Journal of Computational Chemistry* [online]. 1991, roč. 12, č. 2, s. 237-247 [cit. 2015-05-04]. DOI: 10.1002/jcc.540120214. Dostupné z: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jcc.540120214/abstract>.

[26] FAN, C. F., B. D. OLAFSON, M. BLANCO a S. L. HSU. Application of molecular simulation to derive phase diagrams of binary mixtures. *Macromolecules* [online]. 1992, roč. 25, č. 14, s. 3667–3676 [cit. 2015-05-04]. DOI: 10.1021/ma00040a010. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/ma00040a010>.

[27] CHEN, Ch., Ch. H. YU, Y. Ch. CHENG, P. H.F. YU a M. K. CHEUNG. Preparation and characterization of biodegradable nanoparticles based on amphiphilic poly(3-hydroxybutyrate)–poly(ethylene glycol)–poly(3-hydroxybutyrate) triblock copolymer. *European Polymer Journal* [online]. 2006, roč. 42, č. 10, s. 2211–2220 [cit. 2015-04-05]. DOI: 10.1016/j.eurpolymj.2006.07.001. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S001430570600231X>.

[28] ESGUERRA, D. F., W. P. HOFFMAN a M. C. THIES. Molecular structures of the constituents of pyrene pitches. *Fuel* [online]. 2014, roč. 124, s. 133–140 [cit. 2015-03-12]. DOI: 10.1016/j.fuel.2014.01.093. Dostupné z: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0016236114001124>.

[29] NOSÉ, S. A molecular-dynamics method for simulations in the canonical ensemble. *Molecular Physics: An International Journal at the Interface Between Chemistry and Physics* [online]. 1984, roč. 52, č. 2, s. 255-268 [cit. 2015-04-26]. DOI: 10.1080/00268978400101201. Dostupné z: <http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/00268978400101201#>.

[30] BERENDSEN, H.J.C., J.P.M. POSTMA, W.F. VAN GUNSTEREN, A. DINOLA a J.R. HAAK. Molecular dynamics with coupling to an external bath. *The Journal of Chemical Physics* 81 [online]. 1984, roč. 81, č. 8, s. 3684–3690 [cit. 2015-04-26]. DOI: 10.1063/1.448118. Dostupné z: <http://dx.doi.org/10.1063/1.448118>.